



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETICIA SALVIONI ANSALONI

Exossecções de larvas de dípteros (Diptera: Calliphoridae): padronização para obtenção e avaliação *in vitro* da sua ação sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*

Exosecretions of Diptera larvae (Diptera: Calliphoridae): standardization for obtaining and *in vitro* evaluation of their action on the promastigote of *Leishmania amazonensis*

CAMPINAS

2021

LETICIA SALVIONI ANSALONI

Exossecreções de larvas de dípteros (Diptera: Calliphoridae): padronização para obtenção e avaliação *in vitro* da sua ação sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*

Exosecretions of Diptera larvae (Diptera: Calliphoridae): standardization for obtaining and *in vitro* evaluation of their action on the promastigote of *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal, na Área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Animal Biology in the field of Anthropic Relations, Environment and Parasitology.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª SELMA GIORGIO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA LETICIA SALVIONI ANSALONI E
ORIENTADA PELA PATRÍCIA JACQUELINE
THYSSEN

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

An81e Ansaloni, Leticia Salvioni, 1994-
Exossecreções de larvas de dípteros (Diptera: Calliphoridae) :
padronização para obtenção e avaliação *in vitro* da sua ação sobre a forma
promastigota de *Leishmania amazonensis* / Leticia Salvioni Ansaloni. –
Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Patrícia Jacqueline Thyssen.
Coorientador: Selma Giorgio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Mosca-varejeira. 2. Medicamentos - Desenvolvimento. 3. Saúde pública.
4. Leishmaniose. 5. Bactérias. I. Thyssen, Patrícia Jacqueline, 1973-. II.
Giorgio, Selma, 1962-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Exosecretions of Diptera larvae (Diptera: Calliphoridae) :
standardization for obtaining and *in vitro* evaluation of their action on the promastigote of
Leishmania amazonensis

Palavras-chave em inglês:

Blowflies
Drug development
Public health
Leishmaniasis
Bacteria

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Patrícia Jacqueline Thyssen [Orientador]
Carina Mara de Souza
Nahiara Esteves Zorgi

Data de defesa: 26-02-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4482-5824>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1130337526358269>

Campinas, 26 de Fevereiro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). Patrícia Jacqueline Thyssen

Dr.(a) Carina Mara de Souza

Dr(a). Nahiara Esteves Zorgi

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós Graduação da Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

À minha família,

pelo apoio

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais, Júlio e Neide, por toda a dedicação e amor que me trouxeram até aqui. Só tenho a agradecer por todo o apoio que vocês me dão desde sempre. Sei bem dos esforços que fizeram e ainda fazem para que eu tenha uma educação de qualidade, sou eternamente grata a tudo o que fazem por mim. Se me tornei essa pessoa é graças a vocês. E a vó Maria, que mesmo não entendendo tão bem o que eu faço no mestrado, sempre esteve dando um apoio. Obrigada por tudo, amo vocês.

À minha orientadora Patrícia, por ter aceitado meu pedido de estágio e a partir dessa oportunidade ter surgido o mestrado, por acreditar no meu trabalho e me incentivar desde o começo. Por não deixar nunca seus alunos desistirem e sempre mostrar que no final vai dar certo. Obrigada pelos cafezinhos e conversas descontraídas, levarei essa amizade para sempre. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora Selma, por aceitar testar as exossecreções das larvas em *Leishmania* e por me ensinar tudo do zero, nesse novo mundo dos parasitos. Por ter me recebido tão bem e me fazer sentir parte do grupo de pesquisa. Serei eternamente grata a todos seus ensinamentos, seja na carreira profissional como pessoal.

Ao meu namorado Caio, que sempre esteve do meu lado, mesmo no período que ficou fora do país. Que aguentou todas as minhas reclamações, que me ajudou e me ensinou muitas coisas, incluindo estatística haha. Que está comigo desde a graduação, sempre me incentivando e acreditando que eu seria capaz. Obrigada pela amizade e companheirismo, Te amo muito.

Aos meus tios Solange e Osvaldo, por me aceitarem em sua casa, me dando um lar em Sumaré. Ao meu primo Bruno, por me adotar como irmã mais nova, incluindo a parte das implicâncias. E a Denise e Murilo (primo), que mesmo da Alemanha se fizeram presente e me presentaram com o computador que estou escrevendo essa dissertação. Muito obrigada por se tornarem mais família ainda nesse período. Amo vocês e sou eternamente grata.

Aos meus amigos do Laboratório de Entomologia Integrativa, Gabi, Marcela, Thamiris, Ken, Aline, Maria Clara, Gustavo, Maria Carolina, Gisele, Thays, Taís, Bárbara pelo carinho, companhia e amizade que temos. Pela farofa, batata palha e companhia nos almoços e jantares do bandeirão. Especialmente a Gabi que cuidou das minhas larvinhas com tanto carinho.

Aos meus amigos do LabLeish, Marina, Gui, Pedro, Nahi, Thalita e Gabi por todo o companheirismo, ajuda nos experimentos, explicações quando eu não entendia nada de *Leishmania*. Vocês foram fundamentais. Tenho um agradecimento especial a Marina e Gui,

pois além de me aturarem no laboratório, ainda cederem a casa quando eu tinha experimentos; e por animarem as noites quando fazíamos sessão karaokê. Vocês são tudo!

Às minhas amigas da UFSCar, que desde a graduação estão presentes em minha vida, dando apoio e acreditando que eu chegaria até aqui. E a Nat, que além de estar presente desde a graduação também cedeu seu lar para que eu pudesse fazer meus experimentos até altas horas da noite.

À Ariane do LEOM, pelo ensino e ajuda com a Microscopia eletrônica, você é ótima Ari!

Aos meus amigos do departamento de parasitologia, pela companhia em disciplinas, nos corredores e pelas ajudas durante o mestrado. Principalmente, a Karen, Elizabeth, Mariana e Maria Carolina por toda ajuda com experimentos e dúvidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A terapia larval (TL) consiste na utilização de larvas vivas e desinfetadas de moscas necrófagas, criadas em laboratório, sobre feridas de difícil cicatrização visando promover, sobretudo, o processo de reparação tecidual. Além do desbridamento, exercido pelas larvas durante sua alimentação, é conhecido que as excreções e secreções (ES) liberadas pelas mesmas podem ter um importante papel no combate ou controle aos microrganismos que por ventura se encontrem no ambiente da ferida. Protozoários do gênero *Leishmania* causam a leishmaniose, a qual em humanos pode se manifestar clinicamente nas formas tegumentar ou visceral. O tratamento para esta doença tem sido feito através de medicamentos com alto custo e nem sempre eficazes, devido ao surgimento de resistência ou ainda alta toxicidade. No presente estudo objetivou-se (i) padronizar os métodos para obtenção de ES larvais de dípteros focando o melhor custo-eficácia para uso em experimentações *in vitro*, (ii) avaliar *in vitro* o potencial leishmanicida das ES de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*, (iii) analisar o perfil das proteínas presentes nas ES de cada uma das espécies de dípteros visando correlacionar os padrões obtidos com os mecanismos de ação das ES frente aos promastigotas do parasito, (iv) obter curvas dose-resposta das ES de *Ch. megacephala* e *Co. macellaria* contra promastigotas e (v) avaliar se as ES tanto de *Ch. megacephala* quanto de *Co. macellaria* são capazes de alterar a morfologia dos promastigotas de *L. amazonensis*. As espécies de dípteros em questão foram selecionadas devido à sua ampla distribuição em território brasileiro e fácil manutenção em laboratório. Em relação à obtenção das ES, o método que atendeu aos critérios de melhor custo-eficácia foi aquele em que as larvas de terceiro estágio foram submetidas ao jejum (processo pré-extração) por ao menos 8 h, permaneceram por 1 h em salina a 37°C no escuro (processo de extração) e cujo os produtos (ES) obtidos foram esterilizados através de filtro bacteriológico (processo pós-extração). Foi possível identificar que as ES das duas espécies de moscas contêm proteínas de peso molecular entre 11 e 80 kDa. Todos os experimentos *in vitro* para avaliar a ação das ES sobre os promastigotas foram realizados em triplicata e repetidos três vezes em placas com 96 poços a 26°C. Em cada poço foram adicionados 100 µL de meio RPMI com uma concentração de 5×10^5 promastigotas + 100 µL contendo diferentes concentrações de ES (*Co. macellaria*: [4], [3], [2], [1,15], [1] e [0,5] mg/mL; *Ch. megacephala*: [21], [11], [2], [1] e [0,5] mg/mL). Grupos controles (meio RPMI e Anfotericina B) foram observados simultaneamente. Quanto à ação das ES de ambas as espécies, foi significativa na inibição da proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*, em particular nas concentrações mais altas (ES[4], [3] e [2] mg/mL para *Co. macellaria*; ES[21] e [11] mg/mL para *Ch. megacephala*; $p < 0,0001$). Os valores estimados da EC50 das ES de *Co. macellaria* para cada intervalo de observação, 12, 24 e 48 h, respectivamente, foram 2,8, 2,4 e 1,9 mg/mL, enquanto que para *Ch. megacephala* foram 10,4, 14,5 e 5,8 mg/mL, respectivamente. Nas maiores concentrações de ES de *Co. macellaria* ([4], [3] e [2] mg/mL) e de *Ch. megacephala* ([21] e [11] mg/mL) e para todos os intervalos de exposição notou-se que os promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram deformidade no corpo celular e diferenças relativas ao comprimento do corpo celular e dos flagelos. Concluiu-se, assim, que as ES das duas espécies podem ser promissoras para o controle ou inibição de promastigotas de *L. amazonensis*.

Palavras-chaves: varejeiras, terapia larval, leishmaniose, novos alvos terapêuticos, entomologia médica.

ABSTRACT

Larval therapy (LT) consists of using live and disinfected larvae of necrophagous flies, reared in the laboratory, on wounds that are difficult to heal, aiming mainly to promote tissue repair. In addition to the debridement performed by the larvae during their feeding, it is known that the excretions and secretions (ES) released by them can play an important role in fighting or controlling the microorganisms that may be present in the wound environment. Protozoa of the genus *Leishmania* cause leishmaniasis, which in humans can manifest clinically in cutaneous or visceral forms. The treatment for this disease has been done through drugs with high cost, but not always effective due to the appearance of resistance or high toxicity. The present study aimed to (i) standardize the methods for obtaining larvae ES from dipterans focusing on the best cost-benefit for use in *in vitro* experiments, (ii) evaluate *in vitro* the leishmanicidal potential of the ES of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) on the promastigote form of *Leishmania amazonensis*, (iii) to analyze the profile of proteins present in the ES of each blowfly species in order to correlate the patterns obtained with the mechanisms of action of the ES against the promastigotes of the parasite, (iv) obtain dose-response curves of the ES of *Ch. megacephala* and *Co. macellaria* against promastigotes and (v) evaluate whether the ES of both *Ch. megacephala* and *Co. macellaria* are capable of altering the morphology of the promastigotes *L. amazonensis*. The blowfly species in this study were selected due to their wide distribution in Brazilian territory and easy maintenance in the laboratory. In relation to obtaining ES, the method that reached the best cost-benefit criteria was the one whose larvae were fasted (pre-extraction process), remained for 1 h in saline at 37°C in the dark (extraction process) and the obtained product (ES) had been sterilized using a bacteriological filter (post-extraction process). It was possible to identify that the ES of both blowfly species contains proteins with molecular weight between 11 and 80 kDa. All *in vitro* experiments to evaluate the action of ES on promastigotes were performed in triplicate and repeated three times in 96-well plates at 26°C. In each well, 100 µL of RPMI medium with a concentration of 5×10^5 promastigotes + 100 µL containing different concentrations of ES (*Co. macellaria*: [4], [3], [2], [1], [0.5] mg/mL; *Ch. megacephala*: [21], [11], [2], [1] and [0.5] mg/mL). Control groups (RPMI and Amphotericin B) were observed simultaneously. Regarding the ES action of both species, a significant inhibition of the proliferation of *L. amazonensis* promastigotes was observed, particularly at the highest concentrations for *Co. macellaria* (ES[4], [3] and [2] mg/mL) and for *Ch. megacephala* (ES[21] and [11] mg/mL) ($p < 0.0001$). The estimated EC₅₀ values of the ES of *Co. macellaria* for each observed interval of 12, 24 and 48 h, respectively, were 2.8, 2.4 and 1.9 mg/mL, whereas for *Ch. megacephala* were 10.4, 14.5 and 5.8 mg/mL, respectively. In the highest concentrations of ES of *Co. macellaria* ([4], [3] and [2] mg/mL) and of *Ch. megacephala* ([21] and [11] mg/mL), including all exposure intervals, it was noted that *L. amazonensis* promastigotes showed deformity in the cell body and differences in cell length and flagella. Thus, it was possible to conclude that the ES of both blowfly species can be promising for the control or inhibition of *L. amazonensis* promastigotes.

Key words: blowflies, larval therapy, leishmaniasis, new therapeutic targets, medical entomology.

LISTA DE FIGURAS

Introdução e síntese bibliográfica

Figura 1	Ciclo de vida de um díptero muscóide.....	15
Figura 2	Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania sp</i>	21

Capítulo I

Figure 1	Evaluation of the action of 1 mg/mL exosecretions larvae (ES) of <i>Cochliomyia macellaria</i> and <i>Chrysomya megacephala</i> (Calliphoridae) against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A) and <i>Staphylococcus aureus</i> (B) ...	44
Figure 2	Evaluation of the action of 1 mg/mL exosecretions larvae (ES) of <i>Cochliomyia macellaria</i> (Calliphoridae) against <i>Leishmania amazonensis</i> promastigotes	47
Figure 3	Summarization of the steps to obtain the exosecretions larvae (ES) of <i>Chrysomya megacephala</i> and <i>Cochliomyia macellaria</i> (Diptera, Calliphoridae)	48

Capítulo II

Figura 1	Perfil das massas moleculares de proteínas das exossecreções larvais (ES) de <i>Chrysomya megacephala</i> (01) e <i>Cochliomyia macellaria</i> (02) utilizando o SDS-Page. Em (P) padrão de massa molecular	66
Figura 2	Curva de proliferação de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em meio RPMI e tratadas com Anfotericina B e diferentes concentrações de exossecreções larvais (ES) de <i>Cochliomyia macellaria</i> . Letras iguais dentro do mesmo intervalo de tratamento não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)	67
Figura 3	Curva de proliferação de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em meio RPMI e tratadas com Anfotericina B e diferentes concentrações de exossecreções larvais (ES) de <i>Chrysomya megacephala</i> . Letras iguais dentro do mesmo intervalo de tratamento não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)	68
Figura 4	Fotomicrografias de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 12 h de exposição às exossecreções larvais (ES) de <i>Cochliomyia macellaria</i> . Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-H) ES[0,5], ES[1], ES[1,15], ES[2], ES[3] e ES[4], respectivamente	69
Figura 5	Fotomicrografias de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 24 h de exposição às exossecreções larvais (ES) de <i>Cochliomyia macellaria</i> . Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-H) ES[0,5], ES[1], ES[1,15], ES[2], ES[3] e ES[4], respectivamente	70

Figura 6	Fotomicrografias de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 48 h de exposição às exosssecreções larvais (ES) de <i>Cochliomyia macellaria</i> . Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-H) ES[0,5], ES[1], ES[1,15], ES[2], ES[3] e ES[4], respectivamente	71
Figura 7	Fotomicrografias de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 12 h de exposição às exosssecreções larvais (ES) de <i>Chrysomya megacephala</i> . Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-G) ES[0,5], ES[1], ES[2], ES[11] e ES[21], respectivamente	72
Figura 8	Fotomicrografias de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 24 h de exposição às exosssecreções larvais (ES) de <i>Chrysomya megacephala</i> . Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-G) ES[0,5], ES[1], ES[2], ES[11] e ES[21], respectivamente. Nas setas, os vacúolos citoplasmáticos indicam estresse celular	73
Figura 9	Fotomicrografias de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 48 h de exposição às exosssecreções larvais (ES) de <i>Chrysomya megacephala</i> . Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-G) ES[0,5], ES[1], ES[2], ES[11] e ES[21], respectivamente. Nas setas, os vacúolos citoplasmáticos indicam estresse celular	74
Figura 10	Comprimento (µm) (média + desvio-padrão) do corpo celular e do flagelo de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> expostos às diferentes concentrações de exosssecreções larvais (ES) de <i>Cochliomyia macellaria</i> , meio RPMI e Anfotericina B após 12, 24 e 48 h. Letras iguais dentro do mesmo intervalo de tratamento não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)	75
Figura 11	Comprimento (µm) (média + desvio-padrão) do corpo celular e do flagelo de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> expostos às diferentes concentrações de exosssecreções larvais (ES) de <i>Chrysomya megacephala</i> , meio RPMI e Anfotericina B após 12, 24 e 48 h. Letras iguais dentro do mesmo intervalo de tratamento não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)	76

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1	Methods for obtaining larval ES of different species of Calliphoridae (Diptera) considering the larval instar, previous fasting, washing method and larval/vial density in the extraction pre-steps , the volume and solution used during the extraction step , and the storage conditions, sterilization methods and purpose or use in the post-extraction steps [data obtained from the literature]	39
----------------	--	----

SUMÁRIO

1. Introdução e síntese bibliográfica.....	14
1.1. Terapia larval.....	14
1.2. Exossecções de larvas de Diptera.....	16
1.3. Bactérias patogênicas em feridas.....	18
1.4. Leishmaniose	19
1.5. Tratamento de infecções bacterianas em feridas.....	21
1.6 . Tratamento e controle da proliferação de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	23
2. Objetivos	26
3. Capítulo I – Standardization of methods for obtaining of the excretions and secretions of blowflies larvae (Diptera: Calliphoridae) and in vitro evaluation of the antimicrobial action against bacteria and protozoa	27
3.1. Introduction.....	27
3.2. Material and methods	29
3.3. Results	33
3.4. Discussion	34
3.5. References	35
4. Capítulo II – Avaliação in vitro da ação das exossecções de larvas de duas espécies de varejeiras neotropicais (Insecta, Diptera, Calliphoridae) sobre a forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>.....	49
4.1. Introdução	50
4.2. Material e Métodos	52
4.3. Resultados	55
4.5. Discussão.....	58
4.6. Referências	61
5. Conclusões gerais	77
6. Referências bibliográficas.....	78
7. Anexos.....	90
Anexo 1 – Declaração de bioética e biossegurança.	90
Anexo 2. Declaração de direito autoral.....	91

1. Introdução e síntese bibliográfica

1.1. Terapia larval

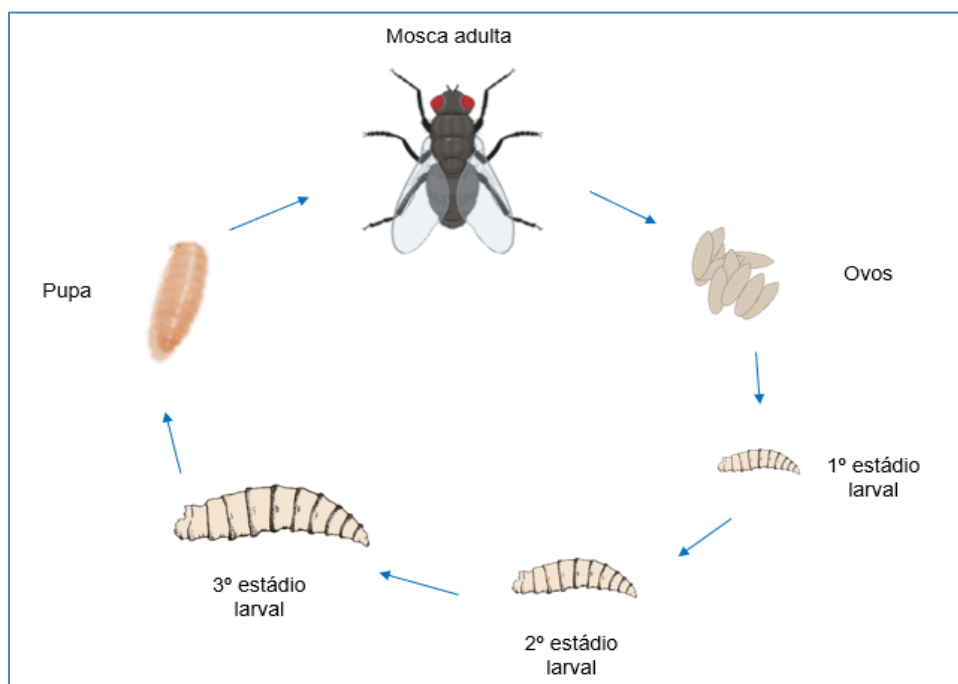
A terapia do desbridamento larval ou terapia larval (TL) consiste no uso de larvas de moscas (Fig. 1) necrófagas vivas, desinfetadas em laboratório, sobre feridas de difícil cicatrização a fim de promover o processo de recuperação tecidual e, conseqüentemente, a cicatrização (Sherman et al., 2000). Esse tratamento tem sido comumente indicado para o tratamento de úlceras do pé diabético, estase venosa, úlceras de pressão, osteomielites, feridas cirúrgicas ou até mesmo traumáticas, por proporcionar um desbridamento (biológico) eficaz, em particular quando o tratamento padrão não apresenta uma boa resposta (IBS, 2020).

Há indícios de que a TL tenha sido usada como uma das estratégias para tratamento de feridas desde a antiguidade por nativos americanos e australianos (Fleischmann et al., 2004). Baer (1931) compilou diversos relatos sobre o uso da TL ao redor do mundo que resultaram em tratamentos bem sucedidos, os quais teriam evitado a amputação, sepse e a morte de indivíduos debilitados e com feridas severas. Após registros pontuais, a partir da década de 1990 e mais fortemente desde 2004, o uso da TL se expandiu pelo mundo devido à busca por tratamentos que pudessem ser mais eficazes no controle de microrganismos resistentes aos antibióticos, associado ao fato da Food and Drug Administration (FDA), principal agência de regulação de medicamentos nos EUA, ter aprovado e reconhecido o uso da TL como tratamento eficaz para o reparo tecidual de lesões de difícil cicatrização (Sherman, 2014). Atualmente, mais de 20 países entre os quais Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido, Suíça, Holanda e Israel utilizam a TL rotineiramente (Nassu & Thyssen, 2015).

Na América do Sul, os resultados obtidos a partir do emprego da TL para o tratamento de feridas em humanos e animais domésticos, independentemente de sua etiologia, tem sido, de forma similar a outros países, bem promissores (por exemplo, Wolff & Hansson, 2003;

Figuerola et al., 2006; Pinheiro et al., 2015; Masiero et al., 2019). No entanto, no Brasil a TL ainda se apresenta incipiente sobretudo devido aos estudos tardios para selecionar espécies de moscas que fossem seguras, eficientes, de fácil manutenção em laboratório para criação massal e com ampla distribuição pelo país (Thyssen et al., 2021). *Lucilia sericata* (Meigen) é reconhecidamente a espécie mais segura e mais usada para fins terapêuticos em diversos locais do mundo (Sherman, 2014), mas com uma distribuição consideravelmente restrita no Brasil, predominando em locais de alta altitude, o que dificultaria, desta forma, sua coleta e manutenção em laboratório (Thyssen et al., 2021). A partir de 2015, apontou-se como espécies seguras e viáveis para uso terapêutico em território brasileiro as moscas *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) (Nassu & Thyssen, 2015; Masiero et al., 2015; Pinheiro et al., 2015; Masiero & Thyssen, 2016; Masiero et al., 2019).

Figura 1. Ciclo de vida de um díptero muscóide.



Na literatura tem sido amplamente divulgado que a utilização das larvas sobre o leito de feridas tem como principal objetivo o desbridamento (Thyssen et al., 2021). Entretanto, as

vantagens ainda pouco elucidadas no que diz respeito aos seus mecanismos de ação vão além de unicamente remover o tecido desvitalizado: larvas de moscas produzem exossecreções (ES), as quais contém, comprovadamente testados, componentes com grande potencial bacteriostático e bactericida (Simmons, 1935; Pavillard & Wright, 1957; Thomas et al., 1999; Čerovský & Bém, 2014; Masiero et al., 2017). A aplicação dos produtos produzidos ou oriundos das larvas de moscas visando à cicatrização e/ou o controle de microrganismos patogênicos representa um grande passo dentro da TL contemporânea, além de contribuir para ampliar a busca e o desenvolvimento por novos fármacos direcionados ao tratamento de feridas de difícil cicatrização.

1.2. Exossecreções de larvas de Diptera

Exossecreções larvais (ES) correspondem ao conjunto de substâncias, secreções e excreções, que são liberadas pelas larvas, as quais podem ter ação digestória, atrativa (no caso de feromônios), antimicrobiana, entre outros (Masiero et al., 2017). Em geral, a composição das ES é variável podendo ser encontradas desde proteases até ácidos graxos e moléculas menores, tais como os peptídeos antimicrobianos (em inglês, AMP) (Bexfield et al., 2004; Cazander et al., 2009; 2010; Arora et al., 2010; Barnes et al., 2010; Ratcliffe et al., 2015; Masiero et al., 2017).

Os mecanismos de ação das ES, ou melhor, dos AMP devido ao fato de serem eles os principais componentes da defesa antimicrobiana de insetos, ainda estão pouco elucidados, eis por isso são alvo de pesquisas mais aprofundadas especialmente no que diz respeito à sua estrutura química. Lambert et al. (1989) isolaram e descreveram os primeiros AMP de larvas de Calliphoridae, *phormia A* e *phormia B*, originários da espécie *Protophormia terraenovae* Robineau-Desvoidy, permitindo que outros pesquisadores seguissem avaliando as

propriedades deste AMP. Posteriormente, novos AMP foram descritos em outras espécies de moscas varejeiras tais como *lucifensina* e *lucimycin*, ambos originários da espécie *L. sericata* (Čeřovský et al., 2010; Pöppel et al., 2014), a *lucifensina II*, produzida por *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (El Shazely et al., 2013) e, mais recentemente, *sarconesina* e *sarconesina II*, isolados de larvas de *Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou) (Diaz-Roa et al., 2018; 2019).

Embora diversos estudos têm demonstrado que as ES larvais são capazes de reduzir a ação de uma ampla gama de bactérias patogênicas, quer sejam estas Gram-positivas ou as Gram-negativas (Simmons, 1935; Thomas et al., 1999; Bexfield et al., 2004; Kerridge et al., 2005; Bexfield et al., 2008; Van Der Plas et al., 2008; Cazander et al., 2009; Harris et al., 2009), não parece haver um consenso na literatura quanto aos processos para extração e obtenção das mesmas (por exemplo, Arora et al., 2011; Polat et al., 2012; Cruz-Savedra et al., 2016; Laverde-Paz et al., 2018). Em muitos protocolos falta detalhamento acerca dos processos de lavagem (tais como temperatura da água ou pH), idade da larva, se a mesma permaneceu em jejum e em quanto tempo, a razão do número de larvas por recipiente (o que pode garantir a sobrevivência e baixo estresse), se o produto final deve ser obtido em água ou salina, entre outros. Todas essas informações, além de serem úteis para obter ES com melhor custo-benefício, também podem ser valiosas para o seu uso *a posteriori* em ensaios *in vitro* ou *in vivo*.

Estudos que investigam o potencial das ES larvais não se limitam apenas às suas ações antimicrobianas ou de reparação tecidual. Novas pesquisas têm apontado que as ES podem ter um importante papel antiparasitário, tais como os que foram conduzidos contra espécies do gênero *Leishmania* por, por exemplo, Polat et al. (2012) e Sanei-Dekhordi et al. (2016).

1.3. Bactérias patogênicas em feridas

Feridas ou lesões tegumentares são caracterizadas por qualquer tipo de ruptura na pele. Além das traumáticas ou por queimadura, as lesões podem ocorrer por diversas etiologias que englobam, comumente, deficiência vascular, doenças parasitárias ou metabólicas tal como o diabetes (Han & Ceilley, 2017). Feridas de difícil cicatrização são aquelas que não caminham para um desfecho, isto é, o completo reparo tecidual (Lazurus et al., 1994). Entre outras causas, o retardo na cicatrização pode estar associado à colonização das feridas por microrganismos, principalmente bactérias patogênicas (Marques & Abbade, 2020).

Embora o tipo e a quantidade de microrganismos possam variar de uma ferida para outra, basicamente todas as feridas estão contaminadas com microrganismos que fazem parte da microflora saprofítica da pele (Cooper & Lawrence, 1996). Em um estudo retrospectivo, coordenado por Bessa et al. (2013), foram avaliadas 312 amostras de feridas de diversas etiologias, localização e evolução (aguda e crônica) de 213 indivíduos constatando que entre as bactéria mais comuns de importância clínica estavam *Staphylococcus aureus* (37%), seguida de *Pseudomonas aeruginosa* (17%), *Proteus mirabilis* (10%), *Escherichia coli* (6%) e *Corinebacterium* spp. (5%).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva presente naturalmente na microbiota humana (Mohamed et al. 2015), entretanto pode infectar feridas com facilidade devido ao fato de acometer pessoas sem qualquer tipo de fator de risco conhecido previamente (Otter & French, 2012). Adicionalmente, está entre uma das bactérias cuja a alta resistência frente à antibióticos como a meticilina e a vancomicina (por esta razão, *S. aureus* também é conhecida pela sigla em inglês MRSA – Multiple-resistant *Staphylococcus aureus*) vem sendo amplamente reportada (Turner et al., 2019). Já *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa que também pode estar presente na microbiota humana, assim como na de outros animais e

vegetais (Ladion et al., 2015). Bessa et al. (2013) relataram que ao avaliar a relação da resistência aos antibióticos dos Gram-negativos mais comumente isolados em seu estudo, *P. aeruginosa* em particular, mostrou uma resistência relativamente alta à maioria dos antibióticos. Stoodley et al. (2002) destacaram que *P. aeruginosa* também apresenta grande facilidade na formação de biofilmes bacterianos. Considerando que mais de 50% das infecções em feridas podem estar associadas à formação de biofilme (Costerton et al., 1999) isto poderia representar um grande prejuízo relativo ao tempo de cicatrização (Serra et al., 2015).

Stulberg et al. (2002) recomendaram que se for necessário o uso de antibióticos para controlar infecções em feridas, em geral, que seja prescrito aqueles ativos contra microrganismos Gram-positivos. Mas, neste mesmo caminho, é importante ressaltar que crianças, pacientes com diabetes ou pacientes com imunodeficiências são mais suscetíveis à infecções por bactérias Gram-negativas (Stulberg et al., 2002).

1.4. Leishmaniose

Parasitas do gênero *Leishmania*, divergindo de outros tripanosomatídeos, possuem duas formas evolutivas: promastigota e amastigota (Fig. 2). A forma promastigota é encontrada no interior do trato digestório do hospedeiro invertebrado (nas Américas, comumente, fêmeas do gênero *Lutzomyia*, um díptero da família Psychodidae) e na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (além do ser humano, canídeos e roedores). Nas primeiras horas, após o repasto sanguíneo, a forma promastigota é caracterizada pelo seu formato alongado, com cinetoplasto anterior ao núcleo; o flagelo é livre na porção anterior da célula. Já a forma amastigota, encontrada no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado, é arredondada e de flagelo curto, não exteriorizado (Uliana, 2012; Reis & Gontijo, 2016).

Há muita controvérsia em relação à taxonomia do gênero. As aproximadamente 20 espécies reconhecidas de *Leishmania* são responsáveis pela leishmaniose, doença que se caracteriza, quanto às suas manifestações clínicas no ser humano, nas formas tegumentar e/ou visceral (Burza et al., 2018). A leishmaniose é endêmica em 98 países e ocupa o nono lugar no *ranking* de doenças mais infecciosas do mundo com mais de 350 milhões de pessoas sob risco de transmissão (Hotez et al., 2004; Alvar et al., 2012; Pace, 2014; WHO, 2018).

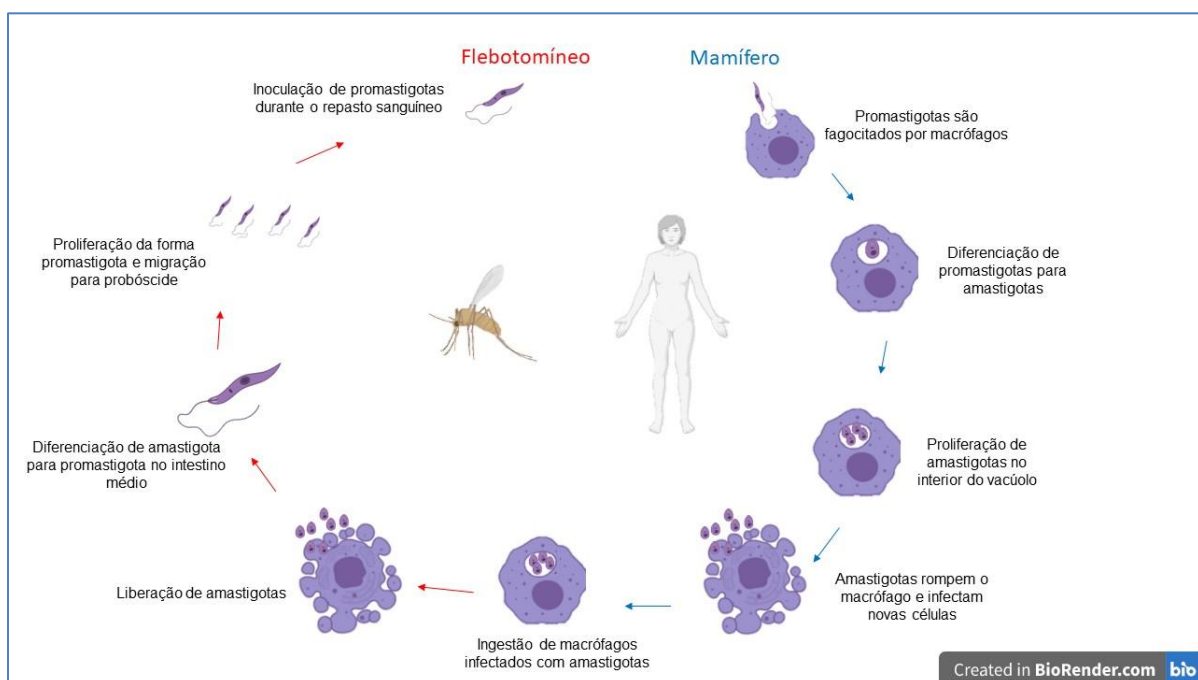
A leishmaniose tegumentar (LT), tendo em vista a localização e a dispersão dos distintos tipos de lesões pelo tegumento, pode ser classificada em cutânea, mucocutânea ou cutânea difusa. Estima-se que cerca de 75% de todos os casos de LT estejam concentrados em 10 países, dos quais quatro estão na região das Américas (Brasil, Colômbia, Peru e Nicarágua). A epidemiologia da LT nas Américas é complexa, com variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão, nos hospedeiros reservatórios, nos vetores flebotomíneos, nas manifestações clínicas e na resposta à terapia, além da possibilidade de múltiplas espécies de *Leishmania* poderem circular na mesma área geográfica (WHO, 2018).

A cada ano uma média de 60 mil casos novos de LT são registrados nas Américas e desses ao menos 50% podem surgir como formas graves e mutilantes (com deformidade e desfiguração), sendo os indivíduos acometidos afastados do trabalho por incapacidade (MS, 2017). Entre as espécies mais comumente registradas em território brasileiro estão *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (Burza et al., 2018).

Nas lesões causadas pela *L. amazonensis* são observados parasitos em proliferação, migração de células inflamatórias e infecções secundárias com bactérias anaeróbicas (Grimaldi, 1993). Essa espécie tem sido alvo de experimentos *in vitro* no Laboratório de Leishmaniose (LabLeish) do Departamento de Biologia Animal da UNICAMP, Campinas, SP, onde são avaliados candidatos a fármacos e conduzidos estudos para elucidar aspectos da biologia celular e imunológicos. Isso se deve à relativa facilidade de cultivo da sua forma

promastigota, pelo tamanho dos amastigotas intracelulares (grandes em relação aos de outras espécies do parasito) possibilitando sua melhor observação e à praticidade para infecção de macrófagos primários ou de linhagem (Colhone, 2004; Henry, 2005; Degrossoli, 2007). Também por essa razão, a espécie de parasito em questão foi selecionada para a avaliação da ação de novos alvos terapêuticos no presente estudo.

Figura 2. Ciclo biológico do protozoário parasito *Leishmania sp.*



1.5. Tratamento de infecções bacterianas em feridas

A terapia antimicrobiana de feridas é bastante complexa e pode envolver desde abordagens sistêmicas (como o uso de antibióticos, inicialmente de largo espectro) até produtos tópicos (exceto em infecções leves), tratamentos locais (como o desbridamento) ou procedimentos cirúrgicos. Gerenciar um quadro infeccioso requer atenção cuidadosa para diagnosticar o agente causal (como por meio da obtenção de amostras adequadas para cultura), selecionar cuidadosamente a terapia antimicrobiana, determinar rapidamente quando as

intervenções são necessárias e fornecer qualquer cuidado adicional necessário que resulte em um tratamento bem sucedido (Lipsky et al., 2020). Uma abordagem sistemática pode permitir a resolução da infecção e a prevenção de complicações, como a amputação de membros (Peters et al., 2016).

Entre os antibióticos mais recomendados estão penicilina, cefalosporina, clindamicina, linezolida, daptomicina, fluoroquinolona, vancomicina (exceto tigeciclina) e sulfa-trimetoprin (no Brasil) (Dumville et al., 2017; Carro et al., 2020). Para administração de qualquer um deles deve ser considerado os riscos sobre efeitos adversos, custo e disponibilidade local.

Em relação aos agentes tópicos e outras abordagens terapêuticas, ainda em fase inicial de investigação (isto é, sem ensaios clínicos concluídos ou com viés frágil) têm sido utilizados, exclusivamente para controle microbiano, o mel, própolis, ácidos graxos, papaína, sulfadiazina de prata (Santos et al., 2011) e a TL (Pinheiro et al., 2015; Fonseca-Muñoz et al., 2020; Masiero et al., 2020).

Investigações sobre o uso tópico do mel para o tratamento de feridas têm sido incentivadas devido às possíveis atividades anti-inflamatória, angiogênica e estimulatória sobre a regeneração tecidual (granulação) (Burlando et al., 2013), além da sua propriedade bactericida (Ferreira et al., 2003). Muito semelhante ao mel, o própolis tópico parece apresentar efeito antimicrobiano, além de anti-inflamatório e cicatrizante (Barbosa et al., 2009).

Outros produtos tais como os ácidos graxos essenciais (também conhecidos como AGE), cuja forma de apresentação é oleaginosa, podem ter um efeito indiretamente benéfico no controle microbiano, a partir de sua ação no desbridamento de feridas, embora já tenha sido observada a sua efetividade especificamente contra *S. aureus* (Hamu et al., 1999; Ferreira et al., 2012). A papaína também tem um importante papel como desbridante, além de sua atividade anti-inflamatória (Moneta, 1987); Leite et al. (2012) sugeriram uma possível ação bactericida, a qual necessita maior investigação. A sulfadiazina de prata, na forma de pomada

ou creme, tem sido amplamente utilizada para combater infecções bacterianas em feridas, em particular aquelas ocasionadas por queimaduras; o uso em coberturas tem mostrado similarmente potencial ação antimicrobiana contra bactérias e fungos (Dowsett, 2004), incluindo *S. aureus* MRSA (Lansdown, 2002; Ferreira et al., 2003).

1.6 . Tratamento e controle da proliferação de parasitos do gênero *Leishmania*

Por seis décadas, os antimônios pentavalentes eram os únicos agentes leishmanicidas disponíveis (Polonio & Efferth, 2008) comercializados sob os nomes de Pentostam® e Glucantime®. Além dos efeitos colaterais, que incluem pancreatite e anormalidades no eletrocardiograma, a eficácia desses agentes tem sido questionada ao longo do tempo. Isso porque tem sido cada vez mais necessário o aumento gradual de suas concentrações até, ao menos, que se atinja o limiar máximo de toxicidade, o que inviabiliza a continuação de muitos tratamentos (Vanaerschot et al., 2014). O próprio mecanismo de ação dos antimoniais até hoje ainda não está totalmente esclarecido (Uliana, 2012).

A Anfotericina B comercializada como Fungizone® e, na forma lipossomal, também conhecida como AmBiosome®, além do custo muito elevado, inclui em seus efeitos colaterais a falência renal, razões estas mais do que suficientes para incentivar a pesquisa por novas drogas, no mínimo mais acessíveis e menos tóxicas ao organismo (Polonio & Efferth, 2008).

A miltefosina, originalmente desenvolvida como antineoplásico e comercializada como Milteforan®, foi o primeiro medicamento leishmanicida (ainda que reposicionado) de uso oral. Apesar dos bons resultados e da efetiva indução do parasito à morte por apoptose (Paris et al., 2004), existem sérias restrições quanto ao seu emprego para o tratamento de mulheres grávidas em virtude de seus efeitos teratogênicos. Recentemente, Coelho (2016) relatou que, assim

como observado para outros medicamentos, já foi identificada a seleção de resistência entre os parasitos de *Leishmania*.

Diante do exposto, há uma clara necessidade em se buscar tratamentos mais eficientes, menos tóxicos e que não promovam a seleção de organismos resistentes (Ponte-Sucre, 2003). Além do mais, o tratamento específico é essencial para limitar a progressão da doença, aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida de pessoas com leishmaniose. A partir desse cenário, pesquisas com foco na investigação de novas moléculas contra o parasito *Leishmania* foram iniciadas com o uso das ES de larvas de dípteros. Arrivillaga et al. (2008), ao aplicar larvas de *L. sericata* diretamente sobre as lesões cutâneas causadas por *L. amazonensis* em hamsters, observaram a formação de tecido de granulação e uma taxa de cicatrização total variando entre 80 e 100% de 24 a 48 h após a remoção das larvas, as quais, por sua vez, permaneceram 12 h no leito da ferida. Após três meses de constante avaliação dos hamsters, registraram que não houve reincidência da ferida causada por *Leishmania*, ratificando a relevância da TL no tratamento da LT.

Cruz-Saavedra et al. (2016) usaram larvas e ES de *L. sericata* e de *S. magellanica* em feridas causadas por *Leishmania panamensis* em hamsters e reportaram melhora nos aspectos das úlceras causadas pelo parasito em todos os grupos experimentais. Polat et al. (2012) avaliaram *in vitro* e *in vivo* o efeito das ES de *L. sericata* sobre *Leishmania tropica* e sugeriram que as ES foram efetivas para o controle do parasito em ambos os casos. Entretanto, análises mais aprofundadas sobre o efeito das ES na morfologia do parasito, assim como a avaliação cinética do efeito leishmanicida e de atividade sobre amastigotas não foram realizadas.

Sanei-Dehkordi et al. (2016) avaliaram *in vitro* a ação das ES de *L. sericata* e *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera, Calliphoridae) sob amastigotas de *Leishmania major*, e *in vivo* em feridas de camundongos BALB/c. Os autores observaram que as ES de *L. sericata* foram mais efetivas contra o parasito do que aquelas de *C. vicina* mostrando, assim, a

importância de avaliar qualitativa e quantitativamente os mecanismos de ação de distintas espécies de moscas.

Com o intuito de investigar o potencial das ES de *Ch. megacephala* e *Co. macellaria* para controlar ou inibir a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*, o presente estudo foi estruturado levando em conta o fato de que nenhuma das duas espécies de díptero até o momento tiveram os mecanismos de ação de suas ES avaliados. Como visto anteriormente, informações obtidas nesta avaliação preliminar poderão subsidiar outras pesquisas que tenham como objetivo o uso de métodos alternativos ou a formulação de fármacos menos tóxicos, frente aos tratamentos convencionais, para o tratamento de pessoas com leishmaniose cutânea.

Almejando o alcance de resultados sólidos, surgiram preocupações quanto à obtenção de ES larvais que pudessem ter melhor custo-eficácia considerando os diferentes microrganismos com que estas vêm sendo testadas. Como notado na revisão de literatura, existem lacunas sobre os processos de extração das ES, além de não ter sido foco de qualquer estudo verificar se a extração deve ser ajustada para fins específicos.

Por fim, observando os problemas que neste estudo objetiva-se superar assim como para melhor organização da exposição dos resultados, esta dissertação foi dividida em dois capítulos, estruturados em formato de manuscritos, como poderá ser visto a seguir.

2. Objetivos

Geral:

- Avaliar a susceptibilidade de *Leishmania amazonensis* frente às exoss secreções (ES) larvais de duas espécies de dípteros (Calliphoridae) com ampla distribuição em território brasileiro.

Específicos:

- Padronizar os métodos para obtenção de ES larvais de dípteros focando o melhor custo-eficácia para uso em experimentações *in vitro*, avaliando a otimização das ES por meio de sua ação sobre um protozoário parasito tegumentar (*L. amazonensis*) e duas bactérias de importância clínica (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) usados como modelo;
- Avaliar *in vitro* o potencial leishmanicida das ES de *Chrysomya megacephala* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) sobre a forma promastigota de *L. amazonensis*;
- Analisar o perfil das proteínas presentes na ES de cada uma das espécies de dípteros visando correlacionar os padrões obtidos com os mecanismos de ação das ES frente aos promastigotas do parasito;
- Obter curvas dose-resposta das ES de *Ch. megacephala* e *Co. macellaria* contra a forma promastigota de *L. amazonensis*;
- Avaliar se as ES tanto de *Ch. megacephala* e *Co. macellaria* são capazes de alterar a morfologia dos promastigotas de *L. amazonensis*.

3. Capítulo I – Standardization of methods for obtaining of the excretions and secretions of blowflies larvae (Diptera: Calliphoridae) and in vitro evaluation of the antimicrobial action against bacteria and protozoa

Letícia S. Ansaloni¹, Franciéle S. Masiero¹, Marcela S. Medina-Cunha¹, Alícia Fonseca-Muñoz², Selma Giorgio¹, Domingos S. Leite¹ and Patricia J. Thyssen¹

¹ Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, São Paulo State, Brazil

² Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Unidad Oaxaca, Santa Cruz Xoxocotlán, Mexico

3.1. Introduction

Over the years, maggot debridement therapy (MDT) has been better known as the technique that consists of applying larvae of live necrophagous flies, produced and disinfected in laboratory, on the bed of difficult-healing wounds in order to stimulate or promote total tissue repair (Sherman et al., 2000). Numerous clinical studies and successful cases have been reported around the world (e.g., Fleishmann et al., 2004; Pinheiro et al., 2015; Fonseca-Muñoz et al., 2020). However, technological advances have shown that larvae, in a wound under treatment, in addition to debriding devitalized tissue, can act by inhibiting or controlling the microbiota (Masiero et al., 2017; 2019), and even modulate the immune response of their host (Honda et al., 2011; Kon and Rai, 2014; Masiero et al., 2015). Antimicrobial activity is perhaps the most motivating reason for the increasing number of MDT research, especially aiming the

search for alternatives to eliminate multidrug resistant bacteria to antibiotics and other microorganisms, using products produced by the larvae.

The evolution of insects' immune response mechanisms against various pathogens stems came from their success in surviving in harsh environments such as food scraps, waste, feces and carcasses, among others (Kruglikova and Chernysh, 2011). The antimicrobial action of larval excretions/secretions (ES), including the destruction of biofilms and synergistic action with antibiotics was evaluated against gram-positive and gram-negative bacteria. Among the most pathogenic are: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* (Bexfield et al., 2004; 2008; Kerridge et al., 2005; Van Der Plas et al., 2010; Jiang et al., 2012; Bohova et al., 2014; Čerovský and Bém, 2014). Other research have also been conducted to evaluate the action of ES against parasites that cause cutaneous wounds such as *Leishmania* (Cruz-Saavedra et al., 2016; Sanei-Dehkordi et al., 2016; Polat et al., 2012)

The antimicrobial potential, in part, comes from cationic antimicrobial peptides (AMP) produced by larvae and predominantly present in their ES (Simmons, 1935; Pavillard and Wright, 1957; Čerovský and Bém, 2014). AMP synthesized in the fatty body, epithelial cells and certain hemolymph cells (Čerovský et al., 2014) are essential elements of the larvae's innate defense system (Hoffmann and Hetru, 1992; Bexfield et al., 2004; Kerridge et al., 2005). Several species of flies in the Calliphoridae family have been reported as a source of AMPs, with emphasis on the defensin of antimicrobial action called *lucifensin*, isolated from *Lucilia sericata* (Meigen) (Čerovský et al., 2010; Valachova et al., 2014). Another recently identified, sequenced and described AMP was *sarconesin*, in reference to the fly *Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou) from Colombia (Díaz-Roa et al., 2018). AMPs from natural sources have become of considerable interest to the pharmaceutical industry. Because they have a fast

and broad-spectrum activity, they would prevent the emergence of resistant microbial strains (Masiero et al., 2017).

Classic biochemical studies, prospecting for biological activities and purification methods, followed by the identification of molecules are of great importance in the characterization of AMP. However, simple obstacles, such as the lack of standardization in the maintenance of insects in the laboratory and in the extraction methods used to obtain large scale ES, delay and discourage the progress of research.

Thus, in this study, we proposed the standardization of methods for obtaining the larvae ES of two species of blowflies, *Co. macellaria* and *Chrysomya megacephala* (Fabricius), aiming at standardization within the best cost-benefit ratio. Additionally, we tested our final product by evaluating the antimicrobial action of the ES obtained against two pathogenic bacteria, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, and the *Leishmania* parasite.

3.2. Material and methods

Obtention of larvae

Colonies of *Ch. megacephala* and *Co. macellaria* were established from adult flies collected in the field (São Paulo State, Brazil, 22°54'21" S, 47°03'39" W) using muscoid traps (Moretti et al., 2009) containing rotten beef liver as bait. The specimens collected were taken to the laboratory alive, temporarily anesthetized by freezing at -20°C for approximately 3 min, identified (Grella and Thyssen, 2011), and transferred to screened plastic cages in a climate-controlled room at 27±1°C, 70±10% relative humidity, and a 12-h photoperiod.

Adult flies were provided water and sugar *ad libitum*. A portion of raw ground beef was used to stimulate the oviposition. With the aid of a brush, the obtained eggs were removed from the substrate and kept on filter paper in a climatic chamber at 25°C for 12 h, until the larvae

hatched. Larvae were allowed to feed on fresh and raw ground beef for 72 h at 25°C. Small portions of fresh beef were added after 24 h and 48 h; in the last 12 h the food had already been exhausted or reduced to minimum quantities leading to a fast of approximately 8 h for the larvae.

Extraction of larval exosecretions (ES)

In order to comprehensively examine the literature on the status of methodologies for obtaining larval ES, the Portuguese, Spanish and English-language, peer-reviewed literature published in academic journals was interrogated in a systematic fashion. Searches across five databases were performed, namely: Web of Science™, PubMed, SCOPUS, Google Scholar™, and Scientific Electronic Library Online (SciELO).

Algorithms and search field combinations [larval excretion/secretion, maggot therapy, maggot secretion, antimicrobial excretion/secretion activity] were explored by trial and error to find those that yielded the most comprehensive and relevant literature without identifying obviously irrelevant literature. Literature searches were conducted between April 2019 and November 2020. Search results were systematically evaluated, and duplicate references were removed. Articles were further preselected based on titles and abstracts, and a thorough assessment of relevance was ascertained by reading the full texts. The full-text review resulted in the exclusion of articles that did not mention the ES extraction methodology.

After gathering and summarizing the steps of several protocols for obtaining the larval ES available in the literature (Table 1), we set up our protocol to start evaluating each of its steps considering the search for the best cost-effectiveness against cutaneous pathogenic microorganisms.

Approximately 300 unsterile third instar larvae of each species were removed from ground beef and transferred into a clean 500 mL washing vial. The unsterile larvae were washed

with for 1,000 mL of distilled water three times, dried with paper towels and transferred to 2-mL microtubes (25-30 live larvae per tube) where part of the microtubes contained approximately 200 μ L of sterile saline and another 200 μ L of sterile distilled water. The tubes were taken to centrifuge at 10,000 g at 4°C for 10 min and then kept in a water bath at 37 \pm 2°C for 1 h in the dark. The larvae were removed from the tubes and discarded, and the ES obtained were filtered (using a 0.22 μ m bacteriological syringe filter), while the other autoclaved at 1 atm, at 121°C for 20 min. All ES were kept refrigerated (15 \pm 2°C) until the beginning of the microbiological evaluation assays.

Preparation of bacterial suspension and cultivation of Leishmania promastigotes

Bacteria stock cultures (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) were cultured onto BHI (Brain Heart Infusion) plates and incubated overnight at 37°C. Three-four colonies of each bacterium with similar morphology were inoculated, separately, into 10 mL sterile LB (Luria-Bertani) broth and incubated overnight at 37°C. The bacterial suspensions were adjusted to 0.5 McFarland Standard with sterile LB broth following the protocol of Teh et al. (2017). The adjustment of bacterial suspensions (1.5×10^8 CFU/mL) to the density of the 0.5 McFarland Standard was done against a white background with contrasting black lines.

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/73/M2269) promastigotes were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 0.1% gentamicin and 10% bovine serum fetal between 26 and 28 °C (Arrais-Silva et al., 2006).

Minimum inhibitory concentration (MIC) analysis

The MIC of antibiotics was determined by a microdilution assay in 96-well microtiter plates according to the broth microdilution guideline of NCCLS (2003).

The antibiotics Ampicillin (Pharmachemie B.V) and Ciprofloxacin (Pharmachemie B.V.) were selected according to antimicrobial sensitivity of the strains under study. In the assays to evaluate the effect of ES of each blowfly species against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, stock solution of each antimicrobial was diluted in sterile distilled water to the final concentration of 10 mg/mL.

Assays to evaluate the effect of ES against bacteria and Leishmania promastigotes

In a 96-well microtiter plate, for each bacterium, the assay composed of 1 vertical row of sterile LB broth, 4 vertical rows of sterile ES (2 rows for each blowfly species), 1 vertical row of growth control (LB + *S. aureus* or *P. aeruginosa* 1:1), 1 vertical row of antibiotic control (Ampicillin or Ciprofloxacin + *S. aureus* or *P. aeruginosa* 1:1), and 4 vertical rows of test (sterile ES of each blowfly species + *S. aureus* or *P. aeruginosa* 1:1). The experimental groups arranged in the vertical lines were tested in quadruplicate (N= 4). A total volume of 200 μ L was introduced into each well.

To evaluate the activity of ES of each blowfly species against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, changes in the optical density (OD) were measured using a SpectraMax™ i3x Multi-Mode Microplate Reader. In this equipment, the microplate was incubated at 37°C. The OD of each well were monitored every 1 h (for up to 6 h) and after 24 h at 540 nm (OD₅₄₀). There was no addition of ES, bacteria or antibiotics in any of the intervals.

In a 96-well microtiter plate, for *Leishmania*, the assay composed of 1 vertical row of growth control (RPMI + 5×10^5 promastigotes parasites), 1 vertical row of antibiotic control (Amphotericin B + 5×10^5 promastigotes parasites 1:1) and 4 vertical rows of test (sterile ES of each blowfly species + 5×10^5 promastigotes parasites 1:1). The experimental groups arranged in the vertical lines were tested in triplicate (N= 3). A total volume of 200 μ L was deposited into each well. The plate was incubated at 26°C.

To evaluate the activity of ES of each blowfly species against *Leishmania* promastigotes the number of viable parasites were counted, with the aid of a Neubauer chamber, at 0 h and after 12, 24 and 48 h of exposure of the parasites to the ES, without replacement, including the medium or Amphotericin in any of the intervals.

Data analysis

Analysis of variance (One-way ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test, was performed to assess the differences among analyzed groups. The level of significance was $\alpha = 0.05$. All analyses were performed using the PROC GLM (General Linear Models) of the R™ (R Core Team, 2017).

3.3. Results

Evaluation of the obtained ES

The results are shown Figures 1 and 2. As seen in Fig. 1, ES obtained through extraction with saline and after sterilized by a bacteriological filter inhibited the growth of *P. aeruginosa* and *S. aureus*. With regard to *P. aeruginosa*, it was observed that the action of ES followed up to the interval of 3 h for *Ch. megacephala* and 2 h for *Co. macellaria* (Fig.1-A), whereas for *S. aureus*, ES of the two blowfly species did not inhibit proliferation in any of the exposure intervals (Fig.1-B).

ES extracted in water altered the homeostasis of *Leishmania amazonensis* promastigote cells, therefore, the parasites suffered apoptosis, immediately after application, and it is not possible to count the proliferation of promastigotes, the best option being the use of saline. When sterilization of ES extracted in saline was performed, due to increased temperature and pressure in the autoclave, we noticed that the proliferation of promastigotes continued to

increase, as did the control group (RPMI) (Figure 2). Finally, when we use the 0.45 μ m filter as a sterilization method, we can see that this methodology presents a promising result in controlling the proliferation of promastigotes.

Optimized ES extraction protocol

Figure 3 summarizes the steps used in this study to obtain the ES products.

3.4. Discussion

Although many protocols for extracting and obtaining dipteran larvae ES are available (e.g., Arora et al., 2011; Polat et al., 2012; Cruz-Savedra et al., 2016; Laverde-Paz et al., 2018), the lack of details about the washing processes (water temperature, pH), larvae manipulation techniques, larvae number per tube to ensure survival and low stress, the number of individuals required to produce 1 mL of ES, on the most appropriate age (second, third or post-feeding instar) of the larvae to extract the ES, which liquid medium (saline or water) is most appropriate to maintain larval survival and stability of the ESs, if the larvae should remain fasting, or not, before extraction and for how long, in summary, information that is useful for obtaining ESs quantitatively and qualitatively optimal for posterior use in the tests.

Some authors like Polat et al. (2012), Bexfield et al. (2004) and Ratcliffe et al. (2015) use water during the process of extracting ES, while others like Cruz-Saavedra et al. (2016), Sanei-Dehkordi et al. (2016) and Horobin et al. (2003) use saline during this process. In view of all these different methodologies, we made the first tests where these different conditions were adjusted above (the new protocol is detailed in the Figure 3). Particularly in relation to the liquid, water or saline used for the extraction of the ES, tests with promastigotes of *Leishmania amazonensis* showed that water strongly alters the homeostasis of the parasites,

where their cell death occurs and for this reason to evaluate the effect ES under *Leishmania* can only be used ES extracted in saline, where we can see the proliferation of promastigotes.

There are several ways in which the larval ES can be sterilized, but it is necessary to understand which would be the ideal one so that the loss of functionality against promastigotes would not occur. Two forms were tested, sterilization by 0.45 µm micropore filter and by autoclaving.

As shown in results, sterile filter ES were promising in controlling the proliferation of promastigotes and *P. aeruginosa*. Studies show that those responsible for the bactericidal/bacteriostatic activities present in ES are mainly proteins, mainly those of lower molecular weight such as AMP (Dimarcq et al., 1988; Kerridge et al., 2005; Huberman et al., 2007; Bexfield et al., 2008; Čerovský et al., 2011; Shazely et al., 2013; Čerovský & Bém, 2014; Józefiak & Engberg, 2017; Díaz-Roa et al., 2018). These proteins, when exposed to excessive heat and temperature break and lose their antimicrobial effect, what was observed in this study.

In the case of *S. aureus*, the non-activity of ES appears to be more related to the lack of action on gram positive bacteria than problems associated with the methods of obtaining ES, since the ES of the two blowfly species showed a good response against a gram negative bacterium. In addition, our results were very similar to those described by Masiero et al. (2017).

Acknowledgements

This study was supported in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil (CAPES) – finance code 001 for the first and third authors. Access registre at Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) - #A60E226.

3.5. References

Arora, S., Sing, L.C., e C. Baptista. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. Int. J. Integr. Biol. 9: 43-48, 2010.

- Arrais-Silva, W.W., Pinto, E.F., Rossi-Bergmann, B., e S. Giorgio. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis* induced soft tissue lesions in mice. *Acta Trop.* 98: 130-136, 2006.
- Bexfield, A., Bond, A.E. and E. Roberts.. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata*. *Diptera: Calliphoridae. Micro. Infect.* 10: 325-333. 2008
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., and N. A. Ratcliffe. Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect.* 6: 1297–1304, 2004.
- Bohova, J., Majtan, J., Majtan, V. and P. Takac. Selective Antibiofilm Effects of *Lucilia sericata* Larvae Secretions/Excretions against Wound Pathogens. *Ev. Bas. Complem. Alt. Med.* 1: 1-9, 2014.
- Cazander, G., Pawiroredjo, J.S., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Schreurs, M.W.J., and G.N. Jukema. Synergism between maggot excretions and antibiotics. *Wound Rep. Reg.* 18: 637-642, 2010.
- Čeřovský V, Slaninová J, Fučík V, Monincová L, Bednářová L, Malón, P, Štokrová, J. Lucifensin, a novel insect defensin of medicinal maggots: synthesis and structural study. *ChemBioChem.* 12, 1352-1361, 2011
- Čeřovský, V. and R. Bém. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: The story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals.* 7: 251-264, 2014.
- Čeřovský, V., Žďárek, J. and V. Fučík. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol. Life Sci.* 67: 455-466, 2010
- Cruz-Saavedra, L., Díaz-Roa, A., Gaona, M.A., Cruz, M.L., Ayala, M., Cortés-Vecino, J.A., Patarroyo, M.A., e F.J. Bello. The effect of *Lucilia sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. *Acta Trop.* 164: 280-289, 2016.
- Díaz-Roa, A., Patarroyo, M.A., Bello, F. and P.I. Silva Junior. Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions and secretions with antibacterial properties. *Front. Microbiol.* 2249: 1-13, 2018
- Dimarcq JL, Keppi E, Dunbar B. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipterin A. *Eur. J. Biochem.* 171, 1-2, 17-22, 1988.

- El Shazely B, Veverka V, Fucík V, Voburka Z, Zdárek J, Cerovský V. Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blow-fly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 50:571—8, 2013
- Fleischmann, W., Grassberger, M. and R. Sherman. Maggot therapy: a handbook of maggot-assisted wound healing. Stuttgart: Thieme Verlag, 2004
- Fonseca-Muñoz, A., Sarmiento-Jiménez, H.E., Pérez-Pacheco, R., Thyssen, P.J. and R. Sherman. Clinical study of Maggot therapy for Fournier's gangrene. *Int. Wound J.* doi:10.1111/iwj.13444, 2020
- Grella, M.D.; Thyssen, P.J. Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil, 2014. Disponível em: <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil> Acesso em 24 de outubro de 2017.
- Hoffmann, J.A., e C. Hetru. Insect defensins: inducible antimicrobial peptides. *Immunol. Today.* 13: 411-415, 1992
- Honda, K., Okamoto, K., Mochida, Y., Ishioka, K., Oka, M., Maesato, K. and K. Doi. A novel mechanism in maggot debridement therapy: protease in excretion/secretion promotes hepatocyte growth factor production. *Am. J. Physiol-Cell Physiol.* 301: 1423-1430, 2011
- Horobin AJ, Shakesheff KM, Woodrow S, Robinson C, Pritchard DI. Maggots and wound healing: the effects of *Lucilia sericata* larval secretions upon human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol.* ;148: 923-933, 2003
- Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu K. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol.* 21, 2, 127-131, 2007.
- Jiang, K.C., Sun, X.J., Wang, W., Liu, L., Cai, Y., Chen, Y.C., Luo, N., Yu, J.H., Cai, D.Y. and A.P. Wang. Excretions/secretions from bacteria-pretreated maggot are more effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One.* 7(11): 1-4, 2012.
- Józefiak A & Engberg RM. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *J. Anim. Feed Sci.* 26(2): 87-99, 2017.
- Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens JR. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol.* 19, 333-337, 2005.
- Kon, K. and M. Rai. Natural Remedies for the Treatment of Wounds and Wound Infection. *In: Microbiology for Surgical Infections.* Academic Press. pp. 187-203, 2014.

- Kruglikova, A.A. and S.I. Chernysh. Antimicrobial compounds from the excretions of surgical maggots, *Lucilia sericata*. Meigen. Diptera, Calliphoridae. Entomol. Rev. 91: 813–819, 2011.
- Masiero, F.S., Aquino, M.F.K., Nassu, M.P., Pereira, D.I.B., Leite, D.S., Thyssen, P.J. First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Neotrop. Entomol. 46, 1, 125-129, 2017.
- Masiero, F.S., Nassu, M.P., Soares, M.P. and P.J. Thyssen. Histological patterns in healing chronic wounds using *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larvae and other therapeutic measures. Parasitol. Res. 114: 2865-2872, 2015.
- Masiero, F.S., Silva, D.G., Luchese, M., Estêrcio, T., Pérsio, N.V. and P.J. Thyssen. In vitro evaluation of the association of medicinal larvae (Insecta, Diptera, Calliphoridae) and topical agents conventionally used for the treatment of wounds. Acta Trop. 190: 68-72, 2019.
- Moretti T.C, Thyssen P.J, Solis D.R. Breeding of the Scuttle Fly *Megaselia scalaris* in a fish Carcass and Implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). Entomol. Gen. 31: 349-353, 2009.
- Pavillard, E.R., e E.A. Wright. An antibiotic from maggots. Nature. 180: 916-917, 1957.
- Pinheiro MARQ, Ferraz J.B, Junior M.A.A, Moura A.D, Costa MESM, Costa FJMD, Neto VFA, Neto R.M, Gama R.A. Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. Indian J. Med. Res. 141: 340-342, 2015.
- Polat, E., Cakan, H., Aslan, M., Sirekbasan, S., Kutlubay, Z., Ipek, T., e A. Ozbilgin. Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions *in vitro* and *in vivo* on *Leishmania tropica*: first work. Exp. Parasitol. 132: 129-134, 2012.
- Ratcliffe, N.A., Vieira, C.S., Mendonça, P.M., Caetano, R.L., Queiroz, M.M.C., Garcia, E.S., Mello, C.B., e P. Azambuja. Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. Acta Trop. 147: 6-11, 2015.
- Sanei-Dehkordi, A., Khamesipour, A., Akbarzadeh, K., Akhavan, A.A., Mohammadi, A.M., Mohammadi, Y., Rassi, Y., Oshaghi, M.A., Alebrahim, Z., Eskandari, S.E., e J. Rafinejad. Anti *Leishmania* activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. Exp. Parasitol. 170: 59-65, 2016.

- Sherman, R., Hall, M.J.R. and S. Thomas. Medical Maggots: an Ancient Remedy for some Contemporary Afflictions. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 55-81, 2000.
- Simmons S. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. *J Bacteriol.* 30, 253-267, 1935.
- Valachova, I., Prochazka, E., Bohova J., Novak, P., Takac, P., e J. Majtan. Antibacterial properties of lucifensin in *Lucilia sericata* maggots after septic injury. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4: 358-361, 2014.
- Van Der Plas M.J, Dambrot C, Dogterom-Ballering H.C, Kruithof S, Van Dissel J.T, Nibbering P.H. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* v.65, n.5, p.917-923, 2010.

Table 1. Methods for obtaining larval ES of different species of Calliphoridae (Diptera) considering the larval instar, previous fasting, washing method and larval/vial density in the **extraction pre-steps**, the volume and solution used during the **extraction step**, and the storage conditions, sterilization methods and purpose or use in the **post-extraction steps** [data obtained from the literature].

Species	PRE-EXTRACTION STEPS				EXTRACTION STEP		POS-EXTRACTION STEPS		
	Larval instar	Period of fasting	Larval density/vial	Larvae whashing	Volume and solution use	Processes	Storage at/under:	Sterilization method	Finality/ Use
<i>Calliphora vicina</i> ; <i>Lucilia sericata</i> [1*]	2 nd and 3 rd instar ———— pre-disinfection of eggs	no	100 larvae /200 mL conical flask	N.M.	750 µL PBS solution	incubation at room temperature for 5 h, in the dark conditions ———— centrifugation at 13,000 g for 7 min	- 20°C	yes ———— sterile filter (0.22 µm)	leishmanicidal
<i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Ch.megacephala</i> <i>Ch. putoria</i> [2]	3 rd instar	18-24 h	1 g larvae/ 200 mL polystyrene bottle	1x sterile ultrapure water	1 µL sterile milli Q water	incubation at 37°C for 1 h ———— centrifugation at 8,000 g	- 20°C	yes ———— sterile filter (0.22 µm)	antibacterial action (gram positive)
<i>Lucilia cuprina</i> (method A) [3]	between 2 nd and 3 rd instar	no	200 larvae cut in half/ vial (capacity N.M.)	3x sterile deionized water and ethanol (concentration N.M.)	PBS solution (volume N.M.)	incubation N.M. ———— centrifugation at 10,000 g for 5 min at 25°C	no	yes ———— sterile filter (0.2 µm) or autoclaved 121°C for 20 min	antibacterial action (gram positive and negative)
<i>Lucilia cuprina</i> (method B) [3]	between 2 nd and 3 rd instar	no	50/200 larvae/ vial (capacity N.M.)	3x sterile deionized water and ethanol	10 mL Luria Bertani agar (LB), supplemented with blood	incubation at 37°C for 24 h	no	yes ———— sterile filter (0.2 µm) or autoclaved	antibacterial action (gram positive and negative)

				(concentration N.M.)	agar with bacterial inoculum			121°C for 20 min	
<i>Lucilia cuprina</i> (method C) [3]	between 2 nd and 3 rd instar	no	500 larvae/vial (capacity N.M.)	3x sterile deionized water and ethanol (concentration N.M.)	2 mL PBS solution	incubation at room temperature for 24 h, closed vial —— centrifugation at 10,000 g for 5 min at 25°C	no	yes —— sterile filter (0.2 µm) or autoclaved 121°C for 20 min	antibacterial action (gram positive and negative)
<i>Lucilia cuprina</i> (method D) [3]	end of 2 nd instar	no	500 larvae/vial (capacity N.M.)	3x sterile deionized water and ethanol (concentration N.M.)	2 mL PBS solution, supplemented with blood agar	incubation at room temperature for 24 h, closed vial —— centrifugation at 10,000 g for 5 min at 25°C	no	yes —— sterile filter (0.2 µm) or autoclaved 121°C for 20 min	antibacterial action (gram positive and negative)
<i>Lucilia cuprina</i> (method E) [3]	between 2 nd and 3 rd instar	no	100 larvae/vial (capacity N.M.)	3x sterile deionized water and ethanol (concentration N.M.)	200 µL PBS solution	incubation at 25°C for 1 h, after transfer ES to new vial	New incubation at 37 °C for 24 h with bacterial inoculum	yes —— sterile filter (0.2 µm) or autoclaved 121°C for 20 min	antibacterial action (gram positive and negative)
<i>Lucilia cuprina</i> [4]	between 2 nd and 3 rd instar —— pre-disinfection of eggs	no	100 larvae/ 15 mL tube	1x 70% alcohol and 2x sterile distilled water	200 µL PBS solution	incubation at 25°C for 1 h, in the dark conditions	room temperature/ - 20°C	yes —— autoclaved 121°C for 20 min	antibacterial action (gram positive)
<i>Lucilia sericata</i> [5]	2 nd and 3 rd instar ——	no	2,500 larvae/ 1 L bequer	N.M.	5 mL distilled water	incubation at room temperature for 6	N.M.	N.M.	leishmanicidal

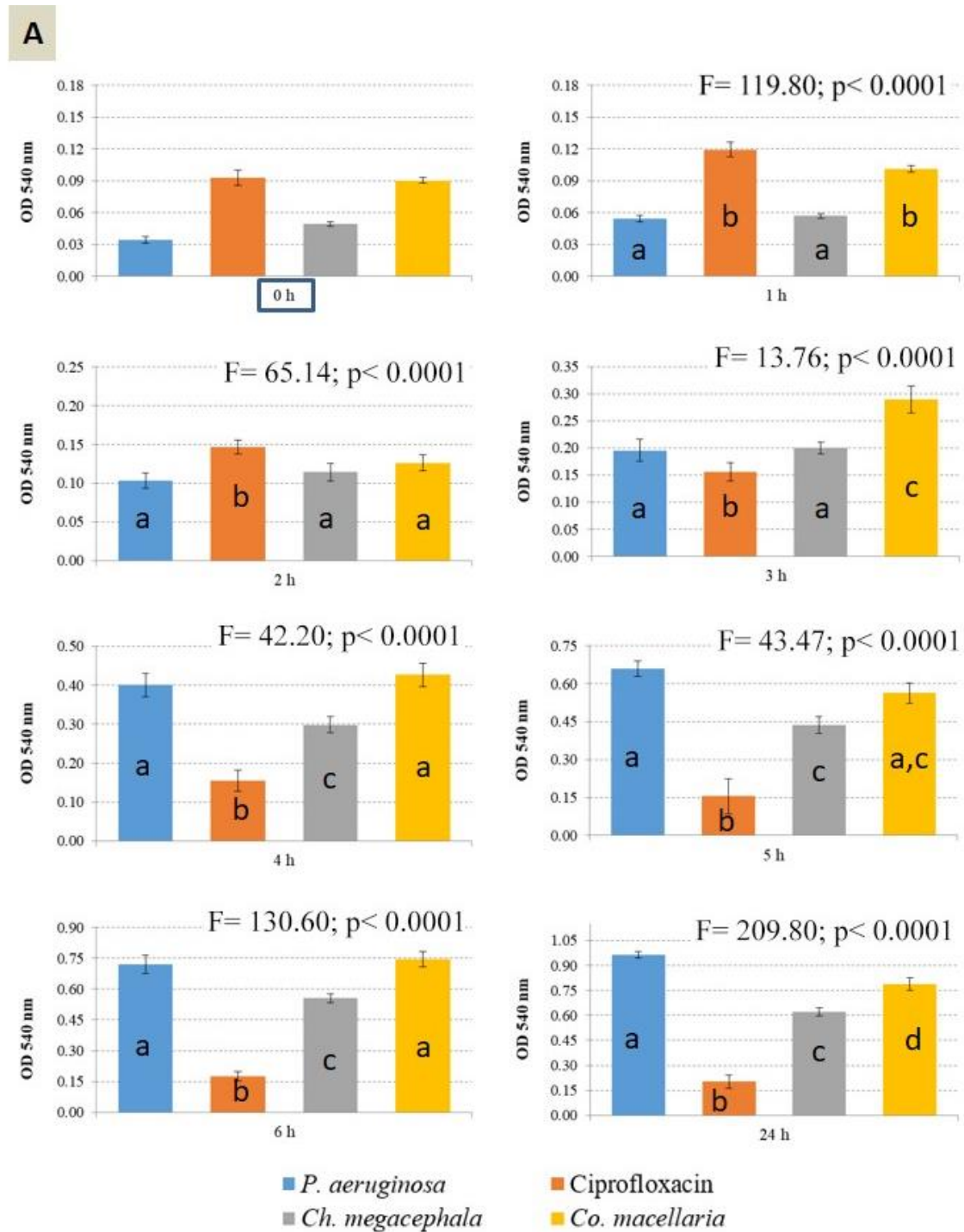
	pre-disinfection of eggs					h, adding water every 2 h			
<i>Lucilia sericata</i> [6]	1 st and 3 rd instar —— pre-disinfection of eggs	no	1 g of larvae	N.M.	200 µL sterile ultrapure milli Q water	incubation at 30°C for 1 h, in the dark conditions —— centrifugation at 10,000 g for 5 min	N.M.	N.M.	antibacterial action (gram positive)
<i>Lucilia sericata</i> [7]	1 st instar —— pre-disinfection of eggs	no	400 larvae/vial (capacity N.M.)	N.M.	1 mL saline	incubation at room temperature for 30 min	N.M.	N.M.	tissue remodelaming
<i>Lucilia sericata</i> [8]	3 rd instar	no	1g larvae/mL	N.M.	sterile deionized water (volume N.M.)	incubation at 30°C for 1 h —— centrifugation at 7,826 g for 5 min	N.M.	yes —— sterile filter (0.22 µm)	antibacterial action (gram positive and negative)
<i>Lucilia sericata</i> (method A)[9]	3 rd instar —— pre-disinfection of eggs	no	50 larvae/vial (capacity N.M)	yes (method N.M.)	200 µL ultrapure milli Q water	incubation at 4°C for 1 h, in the dark conditions —— centrifugation at 20,000 g for 30 min at 4°C	-20°C	N.M.	antibacterial action (gram positive and negative)
<i>Lucilia sericata</i> (method B)[9]	3 rd instar	no	50 larvae/vial (capacity N.M.)	N.M.	200 µL ultrapure milli Q water	incubation at 4°C for 1 h, in the dark conditions ——	-20°C	N.M.	antibacterial action (gram positive and negative)

						centrifugation at 20,000 g for 30 min at 4°C			
<i>Lucilia sericata</i> [10]	2 nd and 3 rd instar**	no	50 larvae/vial (capacity N.M.)	N.M.	200 µL ultrapure milli Q water	incubation at room temperature for 1 h, in the dark conditions —— centrifugation at 1,300g for 5 min at 4°C	- 20°C	N.M.	antimicrobial action
<i>Lucilia sericata</i> (method A)[11]	1 st instar**	no	400 larvae/sterile vial (capacity N.M.)	2x PBS solution	100 µL saline	incubation at 35°C for 1 h, in the dark conditions	- 80°C	N.M.	antibacterial action (gram positive and negative)
<i>Lucilia sericata</i> (method B)[11]	3 rd instar**	no	200 larvae/sterile vial (capacity N.M.)	2x PBS solution	100 µL saline	incubation at 35°C for 1 h, in the dark conditions	-80°C	N.M.	antibacterial action (gram positive and negative)
<i>Lucilia sericata</i> [12]	3 rd instar	no	500 larvae/vial (capacity N.M.)	N.M.	Saline (volume N.M.)	incubation at 37°C for 1 h, in the dark conditions —— centrifugation at 13,000 g for 10 min at 4°C	-20°C	yes —— sterile filter (0.22 µm)	antibacterial action (gram negative)
<i>Lucilia sericata</i> [13]	between 2 nd and 3 rd instar —— pre-disinfection of eggs	no	100 larvae/vial (capacity N.M.)	70% ethanol and ultra pure water	10 mL ultra pure deionized water	incubation at 25°C (overnight) —— centrifugation (parameters N.M.)	N.M.	yes —— sterile filter (0.22 µm)	antibacterial action (gram positive and negative)

<i>Lucilia sericata</i> , <i>Sarconesiopsis</i> <i>magellanica</i> [14]	2 nd and 3 rd instar —— pre- disinfection of eggs	no	200 larvae/ 15 mL Falcon tube	4 x 5 min being: 1x NaClO ₃ 0.5%; 1x CH ₂ O; 2x saline	2 mL saline	incubation at 37°C for 1 h, in the dark conditions —— centrifugation at 3.600g for 5 min	- 20°C	N.M.	leishmanicidal

Note: N.M.= not mentioned. *References: [1] Sanei-Dehkordi et al., 2016; [2] Ratcliffe et al., 2015; [3] Arora et al., 2008; [4] Arora et al., 2011; [5] Polat et al., 2012; [6] Bexfield et al., 2004; [7] Horobin et al., 2003; [8] Barnes et al., 2010; [9] Bohova et al., 2014; [10] Van der Plas et al., 2007; [11] Cazander et al., 2008; [12] Jiang et al., 2012; [13] Kerridge et al., 2005; [14] Cruz-Saavedra et al., 2016. **Commercially purchased sterile larvae.

Figure 1. Evaluation of the action of 1 mg/mL excretions larvae (ES) of *Cochliomyia macellaria* and *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae) against *Pseudomonas aeruginosa* (A) and *Staphylococcus aureus* (B).



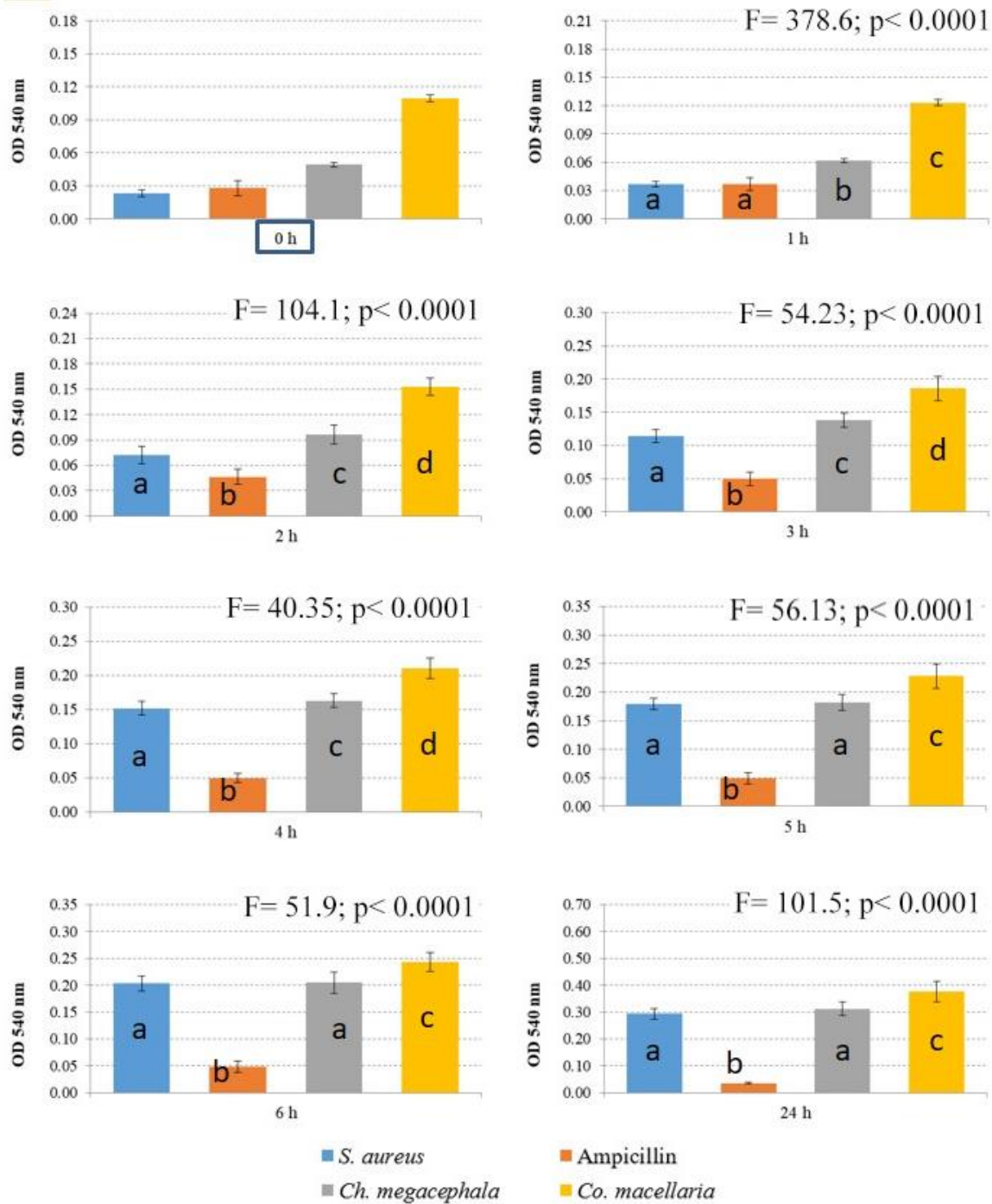
B

Figure 2. Evaluation of the action of 1 mg/mL exosecretions larvae (ES) of *Cochliomyia macellaria* (Calliphoridae) against *Leishmania amazonensis* promastigotes.

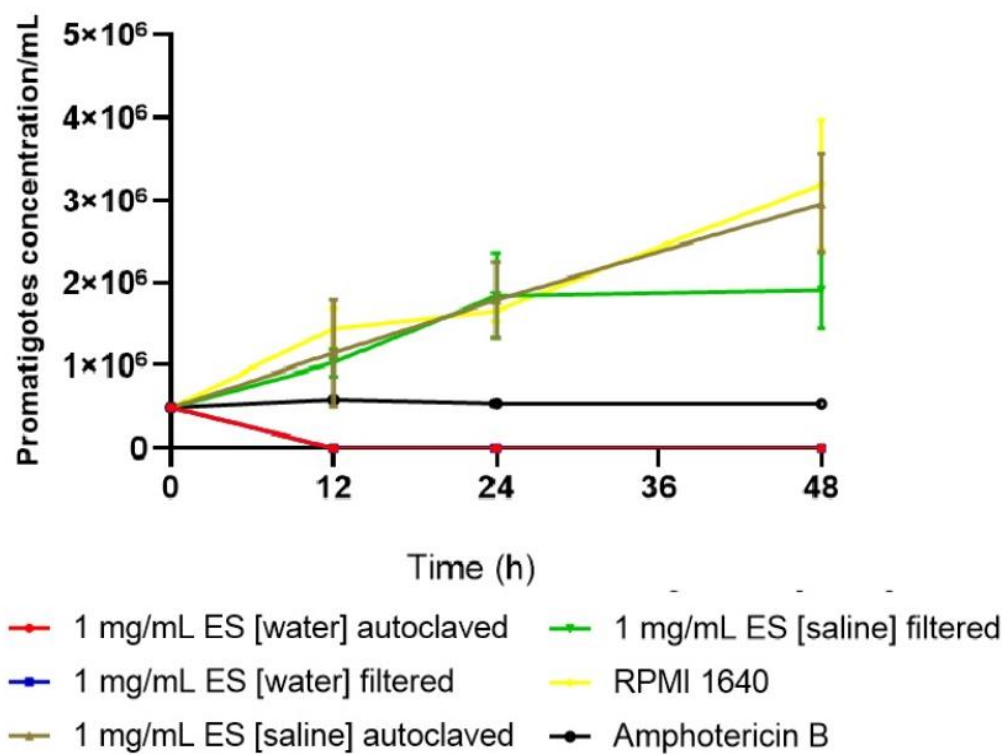


Figure 3. Summarization of the steps to obtain the excretions larvae (ES) of *Chrysomya megacephala* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae).

- 1 • **Transfer** the larvae (that reached the beginning of the 3rd instar) of the diet to a clean container, without diet
- 2 • **Wash** the larvae (fasting from 12 h to a maximum of 18 h) in distilled water at 5 °C (3 x)
- 3 • **Preparation for ES extraction:** place 25 to 30 larvae per 2 mL microtube containing 200 µL of saline
- 4 • **ES extraction I:** keep the microtubes, in a water bath or dry bath, at 37 °C for 1 h
- 5 • **ES extraction II:** remove the larvae and centrifuge the liquid contained in the microtube at 10,000 g at 4 °C for 10 min
- 6 • **ES storage:** non-sterile or sterile: at -20 °C, -70 °C or lyophilized
- 7 • **Sterilization ES I:** using a 0.2 to 0.45 µm bacteriological filter
- 8 • **Sterilization ES II:** by autoclaving at 121 °C and 1 atm for 15-20 min

4. Capítulo II – Avaliação in vitro da ação das exossecções de larvas de duas espécies de varejeiras neotropicais (Insecta, Diptera, Calliphoridae) sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*

Letícia S. Ansaloni¹, Selma Giorgio², Patricia J. Thyssen¹

¹ Laboratório de Entomologia Integrativa, Departamento de Biologia Animal, IB, Universidade de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil

² Laboratório de Leishmaniose, Departamento de Biologia Animal, IB, Universidade de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil

Resumo

Leishmaniose é uma doença que pode se manifestar sob duas formas nos seres humanos: visceral e tegumentar. O tratamento da leishmaniose, por meio dos medicamentos tradicionalmente utilizados para este fim, apresenta alto custo, e nem sempre são eficazes devido ao surgimento de resistência e sua alta toxicidade. No presente estudo objetivou-se avaliar in vitro a susceptibilidade da forma promastigota de *Leishmania amazonensis*, uma das principais causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil, frente às diferentes concentrações de exossecções (ES) larvais de duas espécies de dípteros, *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae). Essas varejeiras foram selecionadas levando em conta a facilidade de manter colônias em laboratório por várias gerações, a ampla distribuição geográfica ao longo de todo território brasileiro e os resultados bem sucedidos no uso destas para o tratamento de lesões tegumentares crônicas. Ensaios foram conduzidos usando seis concentrações de ES (mg de proteínas/mL): 4, 3, 2, 1,15, 1 e 0,5 para *Co. macellaria* e 21, 11, 2, 1 e 0,5 para *Ch. megacephala*. Anfotericina e meio RPMI foram

usadas como controle. Curvas dose-resposta e EC50 contra promastigotas, após exposição às ES de cada espécie de mosca, mostraram que as concentrações 4 mg/mL e 21 mg/mL para *Co. macellaria* e *Ch. megacephala*, respectivamente, foram capazes de inibir a proliferação do parasito.

Palavras-chaves. Terapia do desbridamento larval, moscas, leishmaniose, tratamento, compostos antimicrobianos, *Leishmania amazonensis*.

4.1. Introdução

A leishmaniose é uma doença causada por cerca de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* e é caracterizada nas formas tegumentar e/ou visceral, quanto às suas manifestações clínicas no ser humano (Burza et al. 2018). Divergindo de outros tripanosomatídeos, parasitos do gênero *Leishmania* possuem duas formas evolutivas: promastigota e amastigota (Pace et al. 2014). A forma promastigota é encontrada no interior do trato digestório do hospedeiro invertebrado (fêmeas do gênero *Lutzomyia* nas Américas, um díptero hematófago da família Psychodidae), apresentando formato alongado e o cinetoplasto posicionado anterior ao núcleo, com um flagelo livre na posição anterior da célula. Já a forma amastigota, encontrada em vacúolos de células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, incluindo humanos, canídeos e roedores, apresenta formato arredondado e de flagelo curto não exteriorizado (Uliana 2012; Reis e Gontijo 2016).

A leishmaniose tegumentar (LT), pode ser classificada em cutânea localizada, disseminada, difusa ou mucocutânea, tendo em vista a localização e a dispersão dos distintos tipos de lesões pelo tegumento (Reithinger et al. 2007). Estima-se que cerca de 75% de todos

os casos de LT estejam concentrados em 10 países, dos quais quatro – Brasil, Colômbia, Peru e Nicarágua – estão na região das Américas (WHO 2016). A epidemiologia da LT nas Américas é complexa, com variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão, nos hospedeiros reservatórios, nos vetores, nas manifestações clínicas e na resposta à terapia, além da possibilidade de múltiplas espécies de *Leishmania* circular na mesma região geográfica (WHO 2018). A cada ano uma média de 60 mil casos novos de LT são registrados nas Américas, e destes ao menos 50% podem surgir como formas graves e mutilantes incapacitando os indivíduos acometidos ao trabalho (MS 2017). As espécies mais comuns no território brasileiro são *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (Burza et al. 2018).

Não há vacinas contra as leishmanioses em humanos. Por seis décadas, os antimônios pentavalentes eram os únicos agentes leishmanicidas disponíveis (Polonio e Efferth 2008), porém sua eficácia vem sendo discutida, visto que o aumento gradual de sua concentração vem sendo necessária durante o tratamento, além dos diversos efeitos colaterais que são causados por sua administração, como pancreatite, anormalidades cardíacas e falência renal. A anfotericina B, pentamidina, miltefosina e a paromomicina também são utilizadas no tratamento das leishmanioses, mas nenhum destes fármacos apresenta resultados totalmente satisfatórios (Alvar et al., 2006) Mostrando a necessidade de se buscar novos tratamentos eficientes, menos tóxicos e que não promovam seleção de parasitos resistentes (Ponte-Sucre 2003; Croft et al. 2006).

Em todo o mundo, resultados relativos ao uso de larvas necrófagas e desinfetadas criadas em laboratório para o tratamento de feridas tegumentares têm sido muito promissores (Sherman 2014). Na literatura tem se chamado a atenção para o fato de que a ação das larvas não se restringe ao desbridamento, isto é, ao ato de remover o tecido desvitalizado, a partir da observação do potencial bacteriostático/bactericida das exossecreções (ES) larvais obtidas de inúmeras espécies de dípteros (*e.g.*, Thomas et al. 1999; Mumcuoglu et al. 2001; Bexfield et

al. 2004; Masiero et al. 2017). Em parte, o potencial antimicrobiano é proveniente de peptídeos antimicrobianos (AMPs) catiônicos produzidos pelas larvas e, predominantemente, presentes em suas ES (Simmons 1935; Pavillard e Wright 1957; Čerovský e Bém 2014). Os AMPs sintetizados no corpo gorduroso, nas células epiteliais e em certas células da hemolinfa (Čerovský et al. 2010) são elementos essenciais do sistema de defesa inato das larvas (Hoffmann e Hetru 1992; Kerridge et al. 2005). Várias espécies de moscas da família Calliphoridae têm sido reportadas como fonte de AMPs, com destaque para a defensina de ação antimicrobiana, lucifensina, isolada de *Lucilia sericata* (Meigen) (Čerovský et al. 2010; Valachova et al. 2014). Outro AMP recentemente identificado, sequenciado e descrito foi a sarconesina, em referência à mosca *Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou) encontrada em locais acima de 1200 m por toda a América do Sul, exceto Brasil (Diaz-Roa et al. 2018).

Dado o potencial antimicrobiano das ES larvais, testes contra parasitos do gênero *Leishmania* também têm sido conduzidos ao redor do mundo mostrando promissor controle dos parasitos e remissão das lesões (Arrivillaga et al. 2008; Polat et al. 2012; Cruz-Saavedra et al. 2016; Sanei-Dehkordi et al. 2016). Assim, neste estudo objetivou-se avaliar o perfil de proteínas e a ação das ES produzidas pelas larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae), duas espécies de moscas com ampla distribuição na América do Sul e com histórico de sucesso em seu uso para o tratamento de feridas (Dear 1985; Nassu e Thyssen 2015; Pinheiro et al. 2015; Masiero et al. 2020) contra promastigotas de *L. amazonensis*.

4.2. Material e Métodos

Obtenção das exossecreções (ES) de larvas de dípteros

Colônias de moscas adultas de *Ch. megacephala* e *Co. macellaria* foram estabelecidas em laboratório e mantidas sob condições controladas ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e 12:12h), com alimentação à base de açúcar e proteína e água *ad libitum*. Para estimular a oviposição, uma porção de 50 g de carne bovina moída crua e fresca foi oferecida às fêmeas. Os ovos, colocados sobre a carne, foram transferidos para um recipiente contendo o mesmo substrato em uma proporção de 0,5 g/ovo e mantidos sob as mesmas condições dos indivíduos adultos, até que atingissem o início do terceiro estágio larval.

As larvas foram inicialmente lavadas em água destilada estéril, em seguida transferidas para microtubos de 2 mL contendo 200 μL de solução salina estéril (30 larvas/tubo) e então acondicionadas em banho maria a 37°C por 1 h, sem luz. Após esse período, as larvas foram retiradas e as ES contidas no interior dos microtubos foram centrifugadas a 4°C por 10 min em 10.000 xG. A esterilização das ES ocorreu pela passagem em filtros bacteriológicos de 0,45 μm . Para avaliar a eficiência da esterilização, uma gota de ES foi semeada em placa de Petri com BHI e deixada em estufa a 37°C por 48 h (Thyssen et al. 2013). Após a constatação de que não houve crescimento microbiano, as ES foram armazenadas a -80°C .

Determinação do perfil e da concentração de proteínas das ES

A análise do perfil de proteínas das ES foi feita usando gel de poliacrilamida contendo sódio-dodecyl-sulfato (SDS-PAGE), como descrito por Codonho et al. (2016). Alíquotas de ES filtradas contendo 20 μg de proteínas foram aplicadas, individualmente, em géis de poliacrilamida 15%, após solubilização em tampão desnaturante (1 M de Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, glicerol, bromofenol azul e β mercaptoetanol 2%) 1:2 (v/v) aquecido a 100°C por 5 min. A eletroforese foi realizada no sistema Vert-i10® (Loccus Biotechnology) usando tampão de corrida composto de 125 mM de Tris-HCl, 1,25 mM de glicina e SDS 0,5% (pH 8,6), sob corrente constante de 30 mA. Os pesos das proteínas foram estimados a partir de um marcador

de massa molecular (Cell Signalling® Tech.). O gel foi corado overnight com Comassie® Blue G-250, e as bandas de proteínas foram analisadas. A concentração de proteínas das ES foi determinada pelo método de Bradford (Bradford et al. 1976), sendo usada a solução salina como padrão. Posteriormente, todas as ES tiveram suas concentrações finais de proteína ajustadas (em mg/mL) para a realização dos ensaios experimentais.

Ensaios experimentais com promastigotas de L. amazonensis

Os promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) utilizados neste estudo foram cultivados em meio de cultura RPMI completo (0,1% de gentamicina e 10% de sorofetal bovino SFB) entre 26-28°C (Arrais-Silva et al. 2006).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes, de maneira independente, em placas com 96 poços a 26°C. Em cada poço, para um volume final de 200 µL foram adicionados: 100 µL de meio RPMI com uma concentração de 5×10^5 parasitos na forma promastigota + 100 µL contendo diferentes concentrações de ES (mg/mL) que variaram para cada espécie de califorídeo (*Co. macellaria*: [4], [3], [2], [1,15], [1] e [0,5]; *Ch. megacephala*: [21], [11], [2], [1] e [0,5]). Grupos controles (100 µL de meio RPMI com uma concentração de 5×10^5 parasitos na forma promastigota + 100 µL de meio RPMI ou Anfotericina B, fármaco de escolha no tratamento da leishmaniose) também foram avaliados simultaneamente em cada placa para efeito de comparação. Todas as placas foram mantidas em estufa a 26 ° C. Contagens do número de parasitos viáveis foram feitas em 0 h e após 12, 24 e 48 h de exposição dos promastigotas às distintas concentrações de ES e aos grupos controles, com auxílio de uma câmara de Neubauer. Não houve reposição das ES, RPMI ou Anfotericina B® (Sigma-Aldrich, 1g) em qualquer um dos intervalos mencionados. Os valores de EC50 (inibição de viabilidade em 50%) considerando os diferentes tratamentos para cada espécie foram obtidos através do programa GraphPad Prism® 8.

Avaliação morfológica e morfométrica das formas promastigotas de L. amazonensis

Para avaliar possíveis alterações morfológicas dos parasitos tratados, imagens foram capturadas em microscópio de luz Leica DM4 B® para posterior análise. Adicionalmente, 100 promastigotas de cada grupo experimental foram mensurados (Araújo et al., 2020) com auxílio do software Leica Application Suite® (LAS) versão 4.10.0.

Análise dos resultados

Para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre as formas promastigotas foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores considerando o intervalo de observação e cada tratamento como variáveis respostas. Adicionalmente, diferenças quanto à morfologia, celular e flagelar, foram avaliadas de modo independente por meio de ANOVA de um fator considerando os valores de comprimento como variável resposta. Para cada caso, as médias foram comparadas através do teste de Tukey de comparações múltiplas. Todas as análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism® 8 levando em conta o nível de significância de $\alpha = 0,05$.

4.3. Resultados

Perfil de proteínas das ES larvais das duas espécies avaliadas

O tamanho das proteínas das ES filtradas das duas espécies de moscas variou entre 11 e 80 kDa (Fig. 1). Em contraste com *Ch. megacephala*, as ES de *Co. macellaria* exibiram também outros padrões bem definidos tais como os de aproximadamente 40-45 kDa e 15 kDa (Fig. 1).

Susceptibilidade de L. amazonensis frente às ES de Co. macellaria

Considerando a inibição na proliferação, observou-se que promastigotas de *L. amazonensis* foram mais susceptíveis às maiores concentrações de ES ([4], [3] e [2] mg/mL), tal como esperado para Anfotericina B (Fig. 2). Em menores concentrações ([1,15], [1] e [0,5] mg/mL), o efeito das ES sobre os parasitos se assemelhou ao grupo RPMI (Fig. 2). É importante notar que em todos os intervalos – 12 h ($F=10,52$, $p<0,0001$), 24 h ($F=13,13$, $p<0,0001$) e 48 h ($F=51,13$, $p<0,001$) – foram observadas diferenças significativas entre os distintos tratamentos. Desse modo, os valores da EC₅₀ das ES obtidos para cada intervalo de observação em mg/mL foram: em 12 h= 2,8, em 24 h= 2,4 e em 48 h= 1,9.

Susceptibilidade de L. amazonensis frente às ES de Ch. megacephala

Assim como para *Co. macellaria*, uma susceptibilidade maior de promastigotas de *L. amazonensis* foi observada nas maiores concentrações de ES ([21] e [11] mg/mL), assemelhando-se ao grupo anfotericina (Fig. 3). Já as menores concentrações de ES não foram eficientes no controle da proliferação dos parasitos (Fig. 3). Em todos os intervalos – 12 h ($F=39,59$; $p<0,0001$), 24 h ($F=65,55$; $p<0,0001$) e 48 h ($F=52,38$; $p<0,0001$) – foram observadas diferenças significativas entre os distintos tratamentos. Para *Ch. megacephala*, os valores da EC₅₀ das ES para cada intervalo de observação em mg/mL foram: em 12 h= 10,4, em 24 h= 14,5 e em 48 h= 5,8.

Análises morfológica e morfométrica de promastigotas de L. amazonensis frente às ES de Co. macellaria e Ch. megacephala

Nas maiores concentrações de ES de *Co. macellaria* ([4], [3] e [2] mg/mL) e de *Ch. megacephala* ([21] e [11] mg/mL), em todos os intervalos notou-se que os promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram deformidade no corpo celular, isto é, se encontravam mais

arredondados, quando a morfologia de parasitos saudáveis é caracterizada por corpo alongado, além de flagelo livre e cinetoplasto intacto (Figs. 4-9). Particularmente, nos tratamentos com ES de *Ch. megacephala*, é possível visualizar ainda a formação de pequenos vacúolos citoplasmáticos (Figs. 8 e 9) entre os intervalos de 24 h e 48 h pós-exposição.

Na análise morfométrica do corpo celular de promastigotas de *L. amazonensis* frente às ES de *Co. macellaria*, em todos os intervalos evidenciou-se que os parasitos expostos às maiores concentrações de ES ([4], [3] e [2] mg/mL) foram os que apresentaram menor comprimento ($6,05 \pm 0,3 \mu\text{m}$), embora apenas em 24 h e 48 h tais diferenças tenham sido significativas ($p < 0,05$) quando comparadas aos grupos controles (anfotericina e RPMI) ($7,96 \pm 0,9 \mu\text{m}$) (Fig. 10). Quanto ao comprimento flagelar, observou-se que em 12 h os promastigotas expostos em distintas concentrações de ES tinham seus flagelos ligeiramente maiores ($9,61 \pm 0,5 \mu\text{m}$) do que aqueles dos grupos controles ($8,27 \pm 0,1 \mu\text{m}$), em 24 h sob o efeito das ES [3] e [4] mg/mL e anfotericina os flagelos tinham comprimentos maiores ($11,12 \pm 0,3 \mu\text{m}$) do que os registrados no grupo RPMI ($8,23 \pm 2,5 \mu\text{m}$) e em 48 h todos os parasitos tratados com ES, independente da concentração, tinham flagelos maiores ($10,56 \mu\text{m} \pm 0,90$) do que o que fora observado nos grupos anfotericina e RPMI ($5,81 \pm 1,0 \mu\text{m}$) (Fig. 10).

Sob a ação das ES de *Ch. megacephala*, registrou-se que o corpo celular dos promastigotas após as primeiras 12 h apresentou o menor comprimento nas concentrações mais altas ([11] e [21] mg/mL) ($7,51 \pm 0,8 \mu\text{m}$) quando comparado aos grupos controles RPMI e Anfotericina ($9,93 \pm 0,1 \mu\text{m}$); após 24 h, o comprimento do corpo celular foi significativamente menor nas concentrações de ES [1], [2], [11] e [21] mg/mL ($7,89 \pm 0,3 \mu\text{m}$) quando comparado com as médias dos parasitos dos grupos controles ($8,67 \pm 0,3 \mu\text{m}$), enquanto em 48 h os menores comprimentos do corpo celular foram observados entre os parasitos dos grupos ES [2], [11] e [21] mg/mL ($6,17 \pm 1,1 \mu\text{m}$) (Fig. 11). Relativo ao comprimento flagelar, apenas após 12 h de exposição foi observado que os parasitos expostos às ES [11] mg/mL tinham flagelos de menor

comprimento ($6,68 \pm 2,3 \mu\text{m}$) quando comparado aos dos grupos controles RPMI e Anfotericina ($7,84 \pm 0,1 \mu\text{m}$); para todos os demais intervalos o comprimento dos flagelos nos grupos de parasitos expostos às ES foi significativamente maior do que aqueles dos grupos controles ($p < 0,05$) (Fig. 11).

4.5. Discussão

Ao analisarmos o perfil obtido das ES de ambas as espécies de moscas foi possível notar que suas composições proteicas possuem, predominantemente, proteínas de maior peso molecular, provavelmente, metabólitos secundários como proteases (Giglioti et al. 2016). O peso molecular esperado para os AMP está na faixa entre 4 e 6 kDa (Andersen et al. 2010; Józefiak et al. 2017; Díaz-Roa et al. 2018), em geral, dificilmente visualizado a partir do método SDS-Page.

Estudos como o de Andersen et al. (2010) vêm apontando o potencial bactericida/bacteriostático das ES larvais de dípteros contra diversas bactérias encontradas em lesões tegumentares, incluindo as multirresistentes. Neste estudo, assim como em outros que objetivaram avaliar a ação leishmanicida das ES (por exemplo, Polat et al. 2012; Cruz-Savedra et al. 2016; Sanei-Dehkordi et al. 2016), os AMP ou outras proteínas contidas nas ES não foram isoladas. Como as ES de ambas, *Ch. megacephala* e *Co. macellaria* se comportaram de maneira semelhante ao de outras espécies de moscas cujos AMP foram isolados (Čeřovský et al., 2010, El Shazely et al., 2013, Dimarcq et al., 1988, Chernysh et al., 2002, Díaz-Roa et al., 2018), é possível supor que a ação leishmanicida esteja associada aos AMP, além de algum papel das proteínas de maior peso molecular (proteases) contidas nas ES.

Os resultados aqui obtidos sugerem que tanto as ES de *Co. macellaria* quanto de *Ch. megacephala* são efetivas na redução da proliferação dos promastigotas de *L. amazonensis*,

principalmente nas primeiras 12 h. Resultados semelhantes foram obtidos por Polat *et al.* (2012) em um estudo *in vitro* com outra espécie de mosca, *L. sericata*, sobre os promastigotas de *L. tropica*. É interessante notar ainda que diferentes espécies de moscas podem ter mecanismos distintos de ação, como fora observado aqui entre *Ch. megacephala* e *Co. macellaria* com valores de EC50 para as ES bem maiores para a primeira espécie, quando comparado aos valores da segunda. Do mesmo modo Laverde-Paz et al. (2018), ao avaliarem a ação das ES de *L. sericata* e *S. magellanica* *in vitro* contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania panamensis*, obtiveram valores de EC50 distintos para cada espécie (41,44 µg/mL para *L. sericata* e 23,42 µg/mL para *S. magellanica*), embora para ambas tenha sido reportado um efeito leishmanicida. Exceto em Laverde-Paz et al. (2018), nenhum outro estudo havia estimado os valores de EC50 das ES anteriormente. Nosso estudo é o primeiro a avaliar a ação das ES de *Co. macellaria* e *Ch. megacephala* contra promastigotas de *L. amazonensis*.

Chamamos a atenção para a relevância em se buscar o maior número de parâmetros possíveis para analisar o efeito leishmanicida das ES em adição àqueles apenas de caráter qualitativo. Sanei-Dekordih et al. (2016) compararam o efeito das larvas vivas e das ES das moscas *L. sericata* e *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera, Calliphoridae), enquanto Cruz-Saavedra et al. (2016) conduziram a mesma investigação fazendo uso de *L. sericata* e *S. magellanica*. Nos dois estudos fora observado que tanto as larvas quanto as ES de todas as espécies de moscas exibiram efeito leishmanicida frente *L. major* ou *L. panamensis*. Contudo, não há mais nenhum outro dado que possa ser usado para efeito comparativo tal como os valores de EC50 ou mesmo análises morfométricas das células parasitárias.

Em relação ao corpo celular, as alterações na morfologia observadas nos promastigotas expostos, particularmente, nas maiores concentrações de ES tanto de *Co. macellaria* quanto de *Ch. megacephala*, podem indicar sinais de apoptose, como descrito por Shadab et al. (2017),

Adicionalmente, a presença de vacúolos citoplasmáticos nos promastigotas em contato com as ES de *Ch. megacephala* reforça a aparente sensibilidade do parasito à este produto larval. Luz et al. (2015) também registraram a formação de vacúolos citoplasmáticos de parasitos de *L. infantum* em resposta ao ácido úsnico.

Não há relatos de que outros estudos tenham registrado uma redução significativa do comprimento do corpo celular e do flagelo em parasitos expostos às ES, em comparação aos grupos controles RPMI e Anfotericina. Não foi possível avaliarmos como a redução do tamanho afeta diretamente o parasito, contudo tal achado pode ser útil para compreender, em parte, a ação das ES sobre a inibição da proliferação dos promastigotas em pesquisas futuras utilizando outras abordagens complementares.

Os resultados do nosso estudo são promissores em relação à ação leishmanicida apresentada pelas ES provenientes de espécies de moscas neotropicais. Estudos como este são necessários a fim de conhecer novos componentes que possam ser aplicados em futuros tratamentos menos agressivos para os hospedeiros infectados por parasitos do gênero *Leishmania*.

Agradecimentos

A primeira autora foi financiada em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código 001. Acesso ao registro do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) - #A60E226.

4.6. Referências

- Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M.; WHO Leishmaniasis control team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One.*, 7: 1-12, 2012.
- Andersen, A.S., Sandvang, D., Schnorr, K.M., Kruse, T., Neve, S., Joergensen, B., Karlsmark, T., e K.A. Krogfelt. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 1646-1654, 2010.
- Araújo, T.F, Calarga, A.P, Zorgi, N.E, Rangel, O, Levy, C.E, Giorgio, S. Phenotype evaluation of human and canine isolates of *Leishmania infantum*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 73, p. 101551, 2020.
- Arora, S., Sing, L.C., e C. Baptista. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. *Int. J. Integr. Biol.* 9: 43-48, 2010.
- Arrais-Silva, W.W., Pinto, E.F., Rossi-Bergmann, B., e S. Giorgio. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis* induced soft tissue lesions in mice. *Acta Trop.* 98: 130-136, 2006.
- Arrivillaga, J., Rodriguez, J., e M. Oviedo. Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica.* 28: 305-310, 2008.
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., e N.A. Ratcliffe. Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect.* 6: 1297-1304, 2004.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Burza, S., Croft, S.L., e M. Boelaert. Leishmaniasis. *The Lancet.* 392: 951-970, 2018.
- Cazander, G., Van Veen K.E., Bernards, A.T., e G.N. Jukema. Do maggots have an influence on the bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of five 26 different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata*. *J. Tissue Viability.* 18: 80-87, 2009.
- Čeřovský, V., e R. Bém. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: The story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals.* 7: 251-264, 2014.

- Čerovský, V., Žďárek, J., e V. Fučík. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. Cell Mol. Life Sci. 67: 455-466, 2010.
- Chernysh S, Kim S, Bekker G, Pleskach V, Filatova N, Anikin V. Antiviral and antitumor peptides from insects. PNAS.99:12628—32, 2002.
- Codinho, B.S., Costa, S.S., Peloso, E.F., Joazeiro, P.P., Gadelha, F.R., e S. Giorgio. HSP70 of *Leishmania amazonensis* alters resistance to different stresses and mitochondrial bioenergetics. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 111: 460-468, 2016.
- Croft, S.L., e P. Olliaro. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. Clin. Microbiol. Infect. 17: 1478-1483, 2011.
- Croft, S.L., Sundar, S., e A.H. Fairlamb. Drug resistance in leishmaniasis. Clin. Microbiol. Rev. 19: 111-126, 2006.
- Cruz-Saavedra, L., Díaz-Roa, A., Gaona, M.A., Cruz, M.L., Ayala, M., Cortés-Vecino, J.A., Patarroyo, M.A., e F.J. Bello. The effect of *Lucilia sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. Acta Trop. 164: 280-289, 2016.
- Dear, J.P. A revision of New World Crysomini (Diptera: Calliphoridae). Rev. Bras. Zool. 3: 109-169, 1985.
- Díaz-Roa, A., Patarroyo, M.A., Bello, F., e P.I. Silva-Jr. Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions and secretions with antibacterial properties. Frontiers Microb. 9: 1-13, 2018.
- Dimarcq J.L, Keppi E, Dunbar B. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, diptericin A. Eur. J. Biochem. 171, 1-2, 17-22, 1988.
- El Shazely B, Veverka V, Fucík V, Voburka Z, Zďárek J, Cerovský V. Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blow- fly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol.50:571—8, 2013.
- Giglioti, R., Guimarães, S., Oliveira-Sequeira, T.C.G., David, E.B., Brito, L.G., Huacca, M.E.F., Chagas, A.C.S., e M.C.S. Oliveira. Proteolytic activity of excretory/secretory products of *Cochliomyia hominivorax* larvae (Diptera: Calliphoridae). Pesq. Vet. Bras. 36: 711-718, 2016.

- Han, G., Ceilley, R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Adv. Ther.* 34 (3), 599–610, 2017.
- Hoffmann, J.A., e C. Hetru. Insect defensins: inducible antimicrobial peptides. *Immunol. Today.* 13: 411-415, 1992.
- Józefiak, A., e R.M. Engberg. Insect proteins as a potential source of antimicrobial 27 peptides in livestock production. A review. *J. Anim. Feed Sci.* 26: 87-99, 2017.
- Kerridge, A., Lappin-Scott, H., e J.R. Stevens. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol.* 19: 333-337, 2005.
- Kevric, I., Cappel, M.A., e J.H. Keeling. New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. *Dermatol. Clin.* 33: 579-593, 2015.
- Luz, J.S.B, Oliveira, E.B., Martins, M.C.B., Silva, N.H., Alves, L.C., Santos, F.A.B, Silva, L.L.S., Silva, E.C., e P.L. Medeiros. Ultrastructural analysis of *Leishmania infantum chagasi* promastigotes forms treated in vitro with usnic acid. *Scientific World J.* 2015: 617401, 2015.
- Masiero, F.S., Aquino, M.F., Nassu, M.P., Pereira, D.I., Leite, D.S., e P.J. Thyssen. First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Neotrop. Entomol.* 46: 125-129, 2017.
- Masiero, F.S., Silva, D.G., Luchese, M., Estêrcio, T., Pérsio, N.V. and P.J. Thyssen. In vitro evaluation of the association of medicinal larvae (Insecta, Diptera, Calliphoridae) and topical agents conventionally used for the treatment of wounds. *Acta Trop.* 190: 68-72, 2019.

- MS. Ministério da Saúde Brasileiro, Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. 189 p, 2017.
- Mumcuoglu, K.Y., Miller, J., Mumcuoglu, M., Friger, M., e M. Tarshis. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol. 38: 161-166, 2001.
- Nassu, M. P., and P. J. Thyssen. Evaluation of larval density *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic use in the recovery of tegumentar injuries. Parasitol. Res. 114: 3255–3260, 2015.
- Pace, D. Leishmaniasis. J. Infect. 69: 1-9, 2014.
- Pavillard, E.R., e E.A. Wright. An antibiotic from maggots. Nature. 180: 916-917, 1957.
- Pinheiro, M.A.; Ferraz, J.B.; Junior, M.A.; Moura, A.D.; Costa, M.E.; Costa, F.J.; Neto, V.F.; Neto, R.M.; Gama, R.A. Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. Indian. J. Med. Res., 141: 340-342, 2015.
- Polat, E., Cakan, H., Aslan, M., Sirekbasan, S., Kutlubay, Z., Ipek, T., e A. Ozbilgin. Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions *in vitro* and *in vivo* on *Leishmania tropica*: first work. Exp. Parasitol. 132: 129-134, 2012.
- Polonio, T., e T. Efferth. Leishmaniasis: drug resistance and natural products. Int. J. Mol. Med. 22: 277-286, 2008.
- Ponte-Sucre, A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. Kinetoplastid. Biol. Dis. 2: 14, 2003.
- Ratcliffe, N.A., Vieira, C.S., Mendonça, P.M., Caetano, R.L., Queiroz, M.M.C., Garcia, E.S., Mello, C.B., e P. Azambuja. Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. Acta Trop. 147: 6-11, 2015.
- Reis, A.B., e C.M.F. Gontijo. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36: 71-80, 2016.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., e S. Brooker. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect. Dis. 7: 581-596, 2007.

- Sanei-Dehkordi, A., Khamesipour, A., Akbarzadeh, K., Akhavan, A.A., Mohammadi, A.M., Mohammadi, Y., Rassi, Y., Oshaghi, M.A., Alebrahim, Z., Eskandari, S.E., e J. Rafinejad. Anti *Leishmania* activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. *Exp. Parasitol.* 170: 59-65, 2016.
- Shadab, M.D., Jha, B., Asad, M., Deepthi, M., Kamran, M., e N. Ali. Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. *PLoS One.* 12: e0171306. 2017.
- Sherman, R.A. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here? *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014: 592419, 2014.
- Simmons, S.W. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. *J. Bacteriol.* 30: 253-267, 1935.
- Thomas, S., Andrews, A.M., Hay, H.P., e S. Bourgoise. The anti-microbial activity of maggots: results of preliminary study. *J. Tissue Viab.* 9: 127-132, 1999.
- Thyssen, P.J., Nassu, M.P., Nitsche, M.J.T., e D.S. Leite. Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. *J. Med. Sci.* 4: 405-409, 2013.
- Uliana, S.R.B. *Leishmania* e leishmanioses. In: Ferreira, M.U. (org) *Parasitologia contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. pp. 47-56, 2012.
- Valachova, I., Prochazka, E., Bohova J., Novak, P., Takac, P., e J. Majtan. Antibacterial properties of lucifensin in *Lucilia sericata* maggots after septic injury. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4: 358-361, 2014.
- WHO. 2016. World Health Organization – Leishmaniasis, fact sheet. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acessado em 24 set 2020.
- WHO. 2018. World Health Organization – Status of endemicity and disease burden worldwide. <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acessado em 25 set 2020

Figura 1. Perfil das massas moleculares de proteínas das exosssecções larvais (ES) de *Chrysomya megacephala* (01) e *Cochliomyia macellaria* (02) utilizando o SDS-Page. Em (P) padrão de massa molecular.

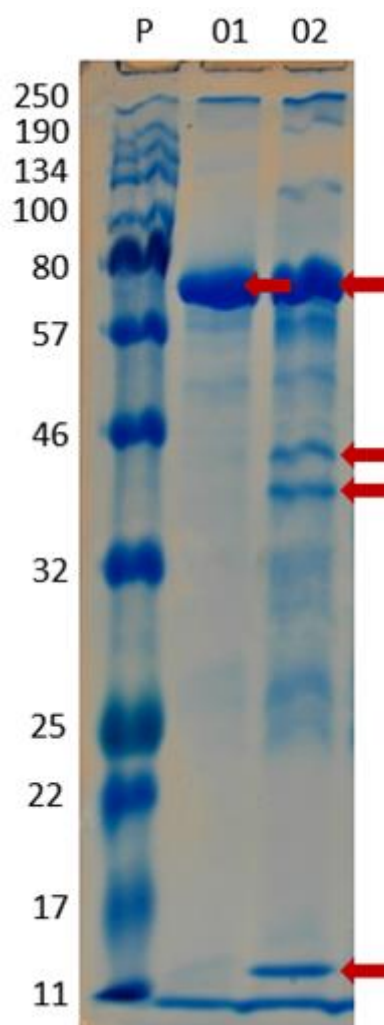


Figura 2. Curva de proliferação de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em meio RPMI e tratadas com Anfotericina B e diferentes concentrações de exosscreções larvais (ES) de *Cochliomyia macellaria*. Letras iguais dentro do mesmo intervalo de tratamento não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

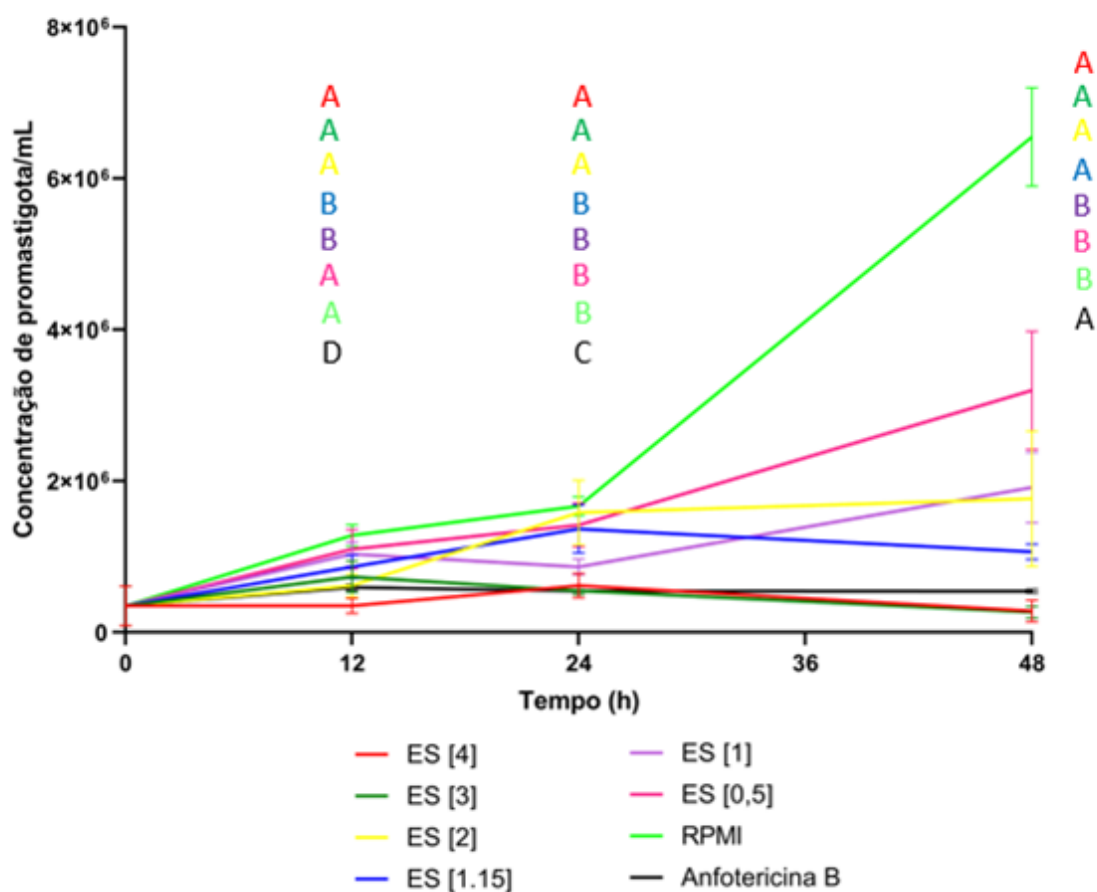


Figura 3. Curva de proliferação de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em meio RPMI e tratadas com Anfotericina B e diferentes concentrações de exosscreções larvais (ES) de *Chrysomya megacephala*. Letras iguais dentro do mesmo intervalo de tratamento não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

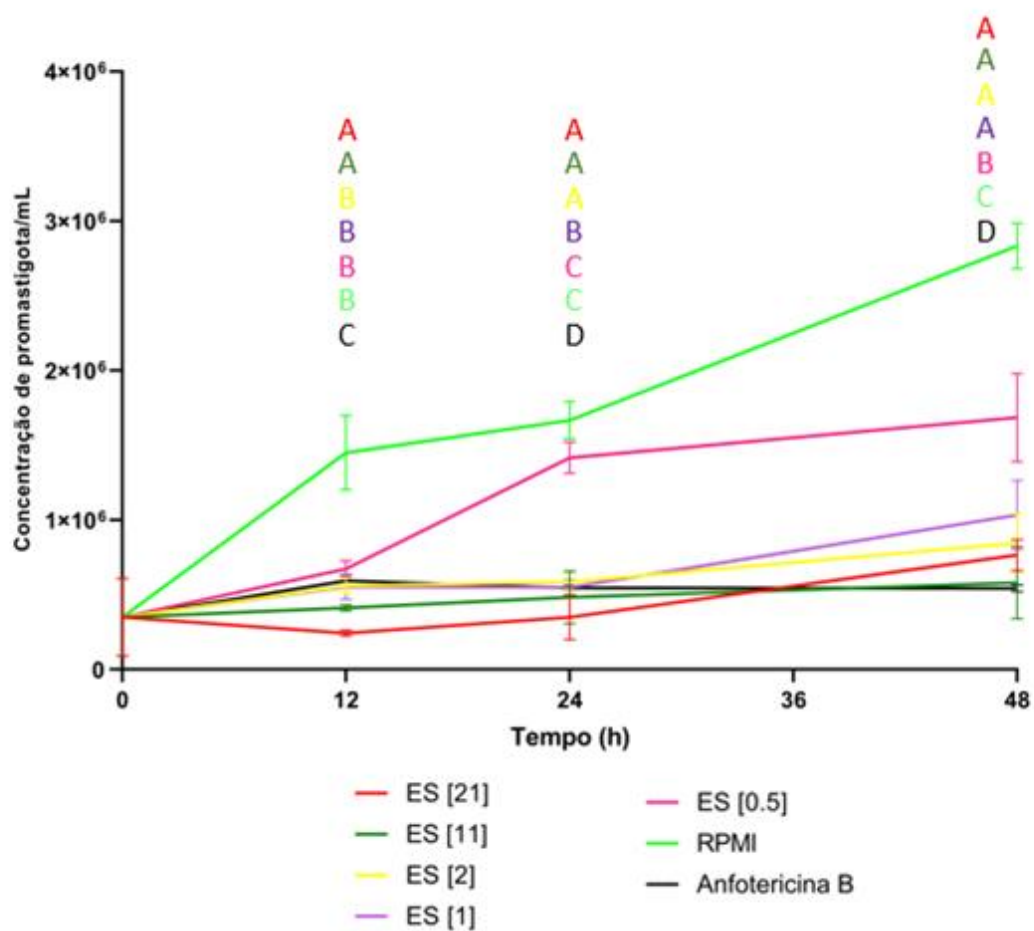


Figura 4. Fotomicrografias de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 12 h de exposição às exosscreções larvais (ES) de *Cochliomyia macellaria*. Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-H) ES[0,5], ES[1], ES[1,15], ES[2], ES[3] e ES[4], respectivamente.

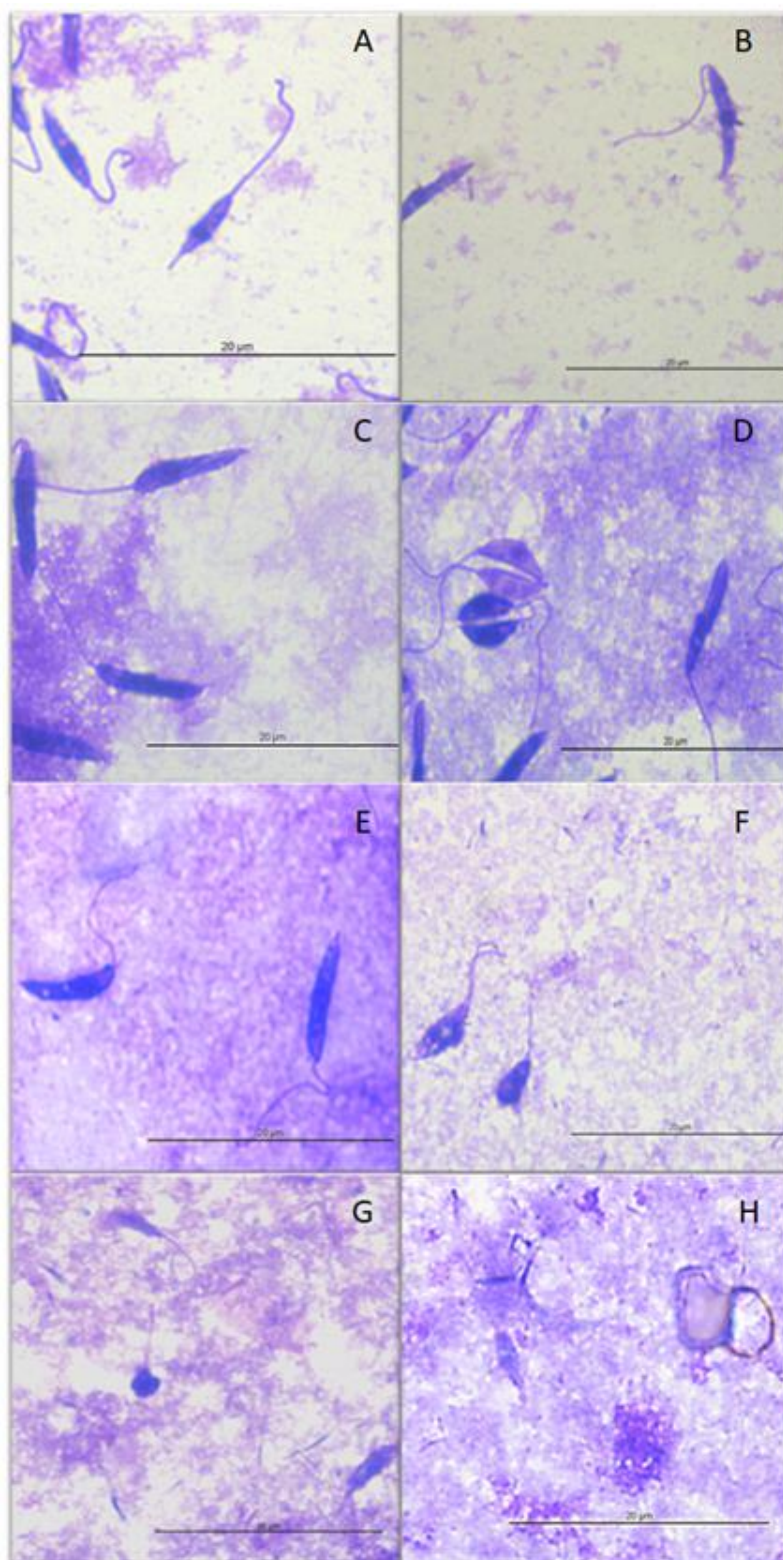


Figura 5. Fotomicrografias de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 24 h de exposição às exosscreções larvais (ES) de *Cochliomyia macellaria*. Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-H) ES[0,5], ES[1], ES[1,15], ES[2], ES[3] e ES[4], respectivamente.

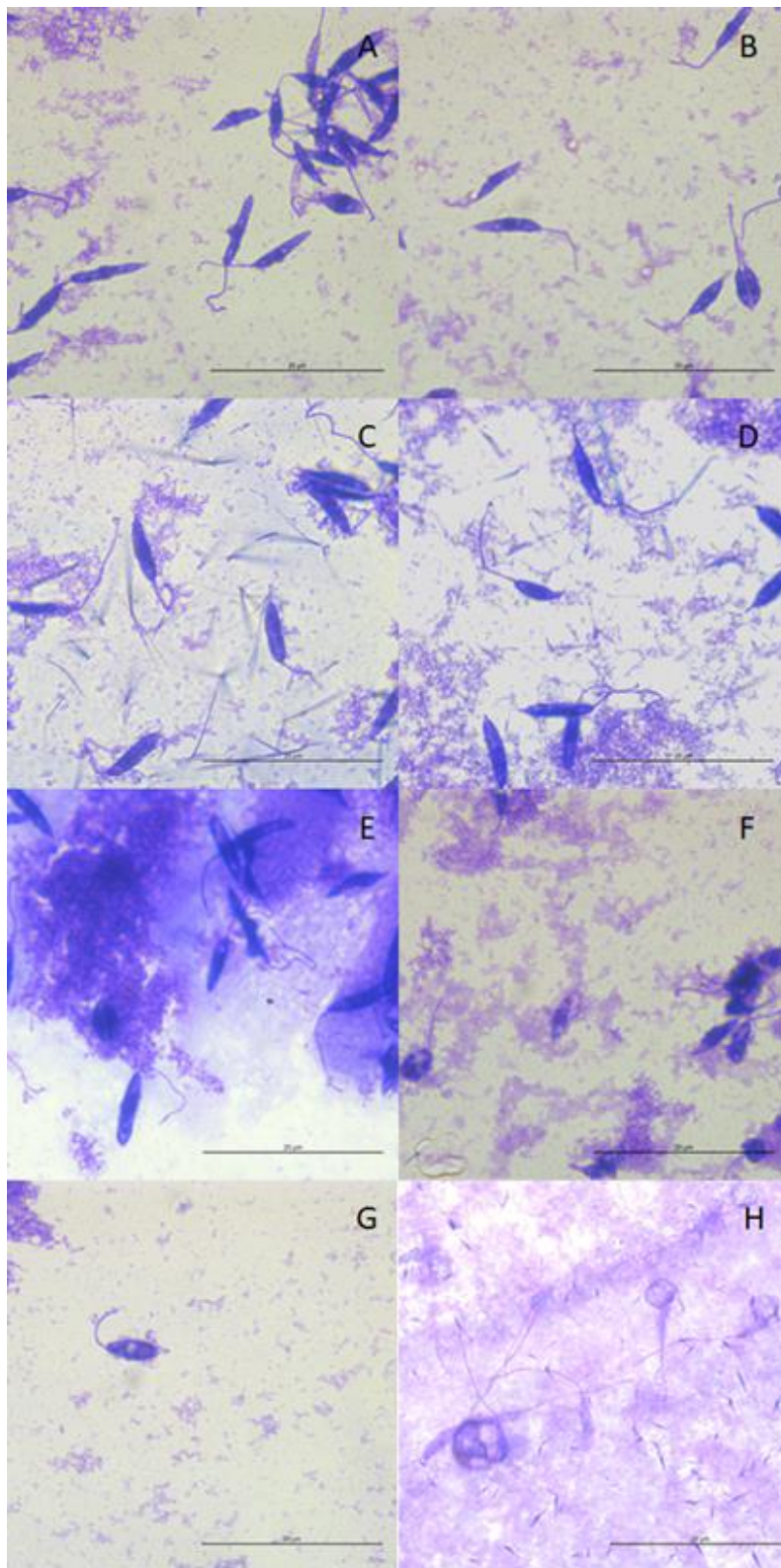


Figura 6. Fotomicrografias de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 48 h de exposição às exosscreções larvais (ES) de *Cochliomyia macellaria*. Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-H) ES[0,5], ES[1], ES[1,15], ES[2], ES[3] e ES[4], respectivamente.

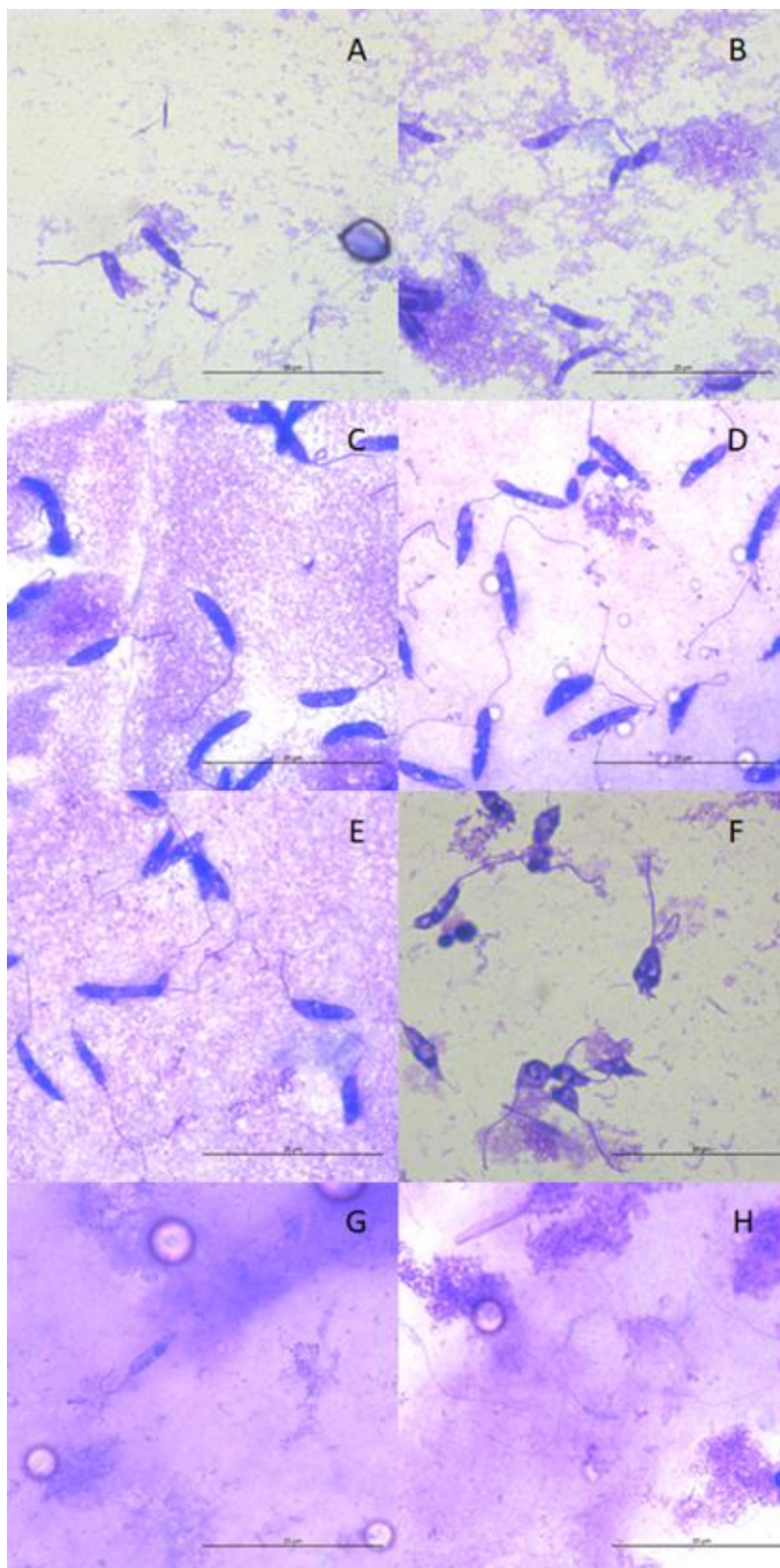


Figura 7. Fotomicrografias de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 12 h de exposição às exosscreções larvais (ES) de *Chrysomya megacephala*. Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-G) ES[0,5], ES[1], ES[2], ES[11] e ES[21], respectivamente.

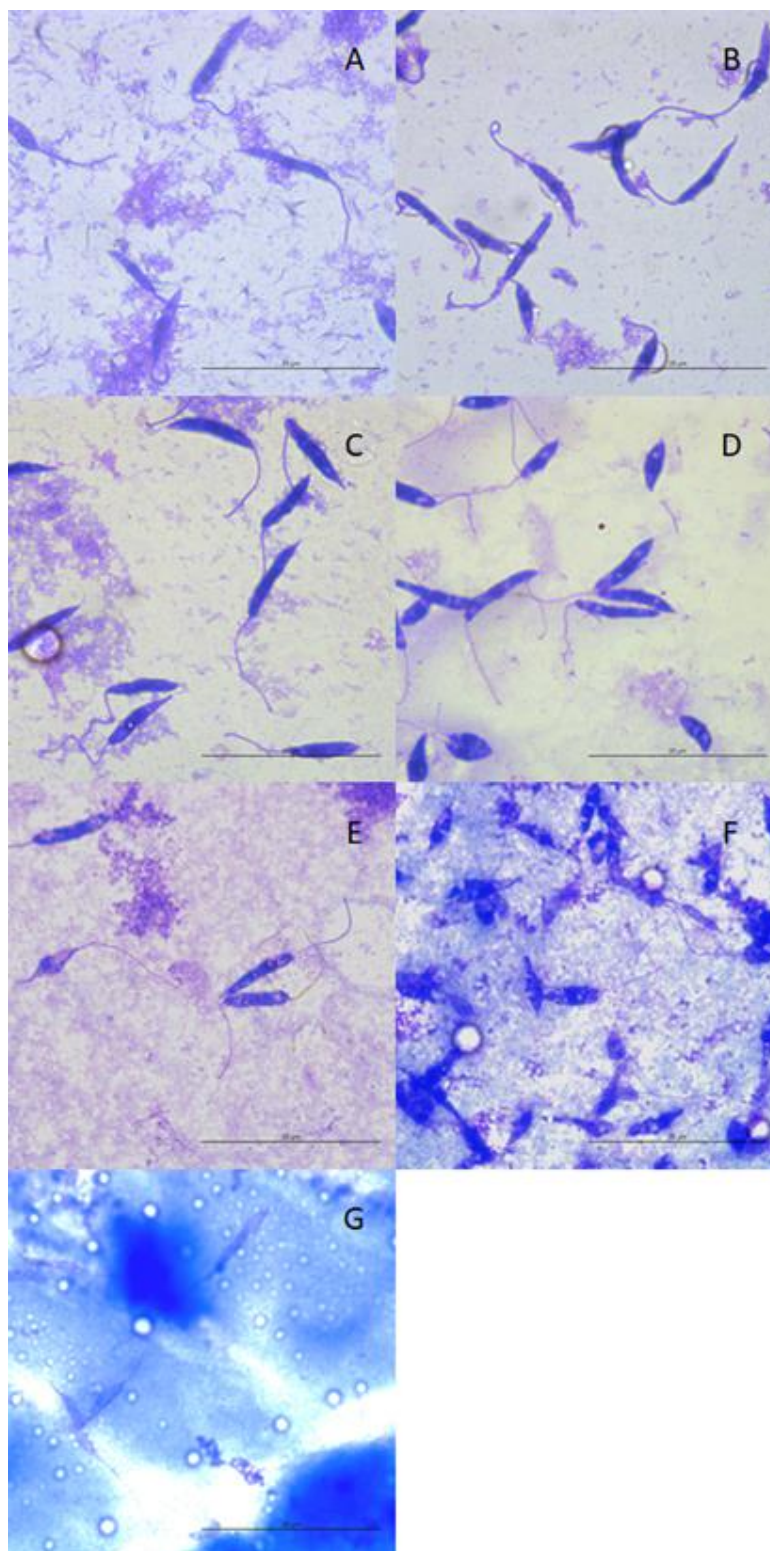


Figura 8. Fotomicrografias de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 24 h de exposição às exosscreções larvais (ES) de *Chrysomya megacephala*. Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-G) ES[0,5], ES[1], ES[2], ES[11] e ES[21], respectivamente. Nas setas, os vacúolos citoplasmáticos indicam estresse celular.

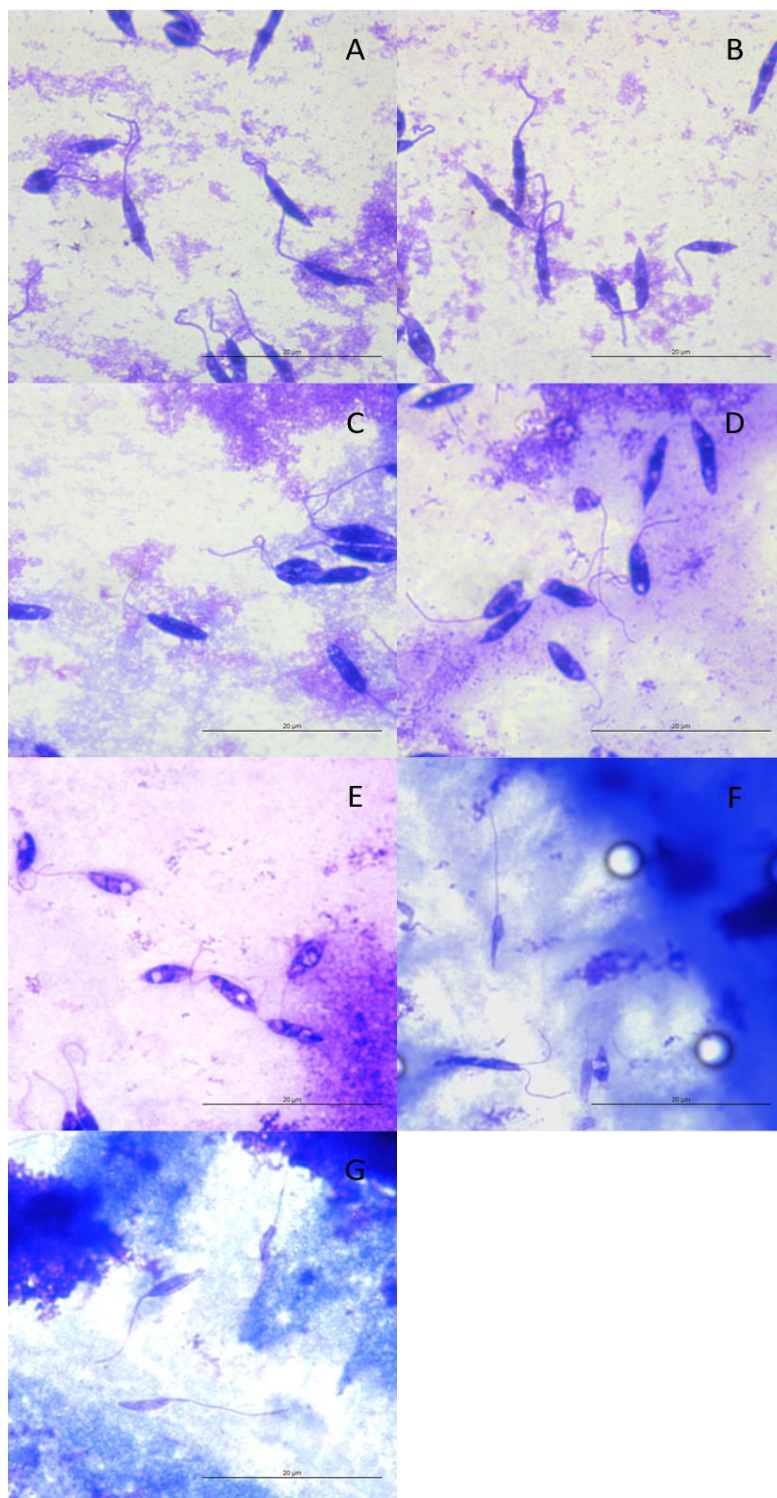


Figura 9. Fotomicrografias de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 48 h de exposição às exosscreções larvais (ES) de *Chrysomya megacephala*. Em: (A) meio RPMI; (B) Anfotericina B; (C-G) ES[0,5], ES[1], ES[2], ES[11] e ES[21], respectivamente. Nas setas, os vacúolos citoplasmáticos indicam estresse celular.

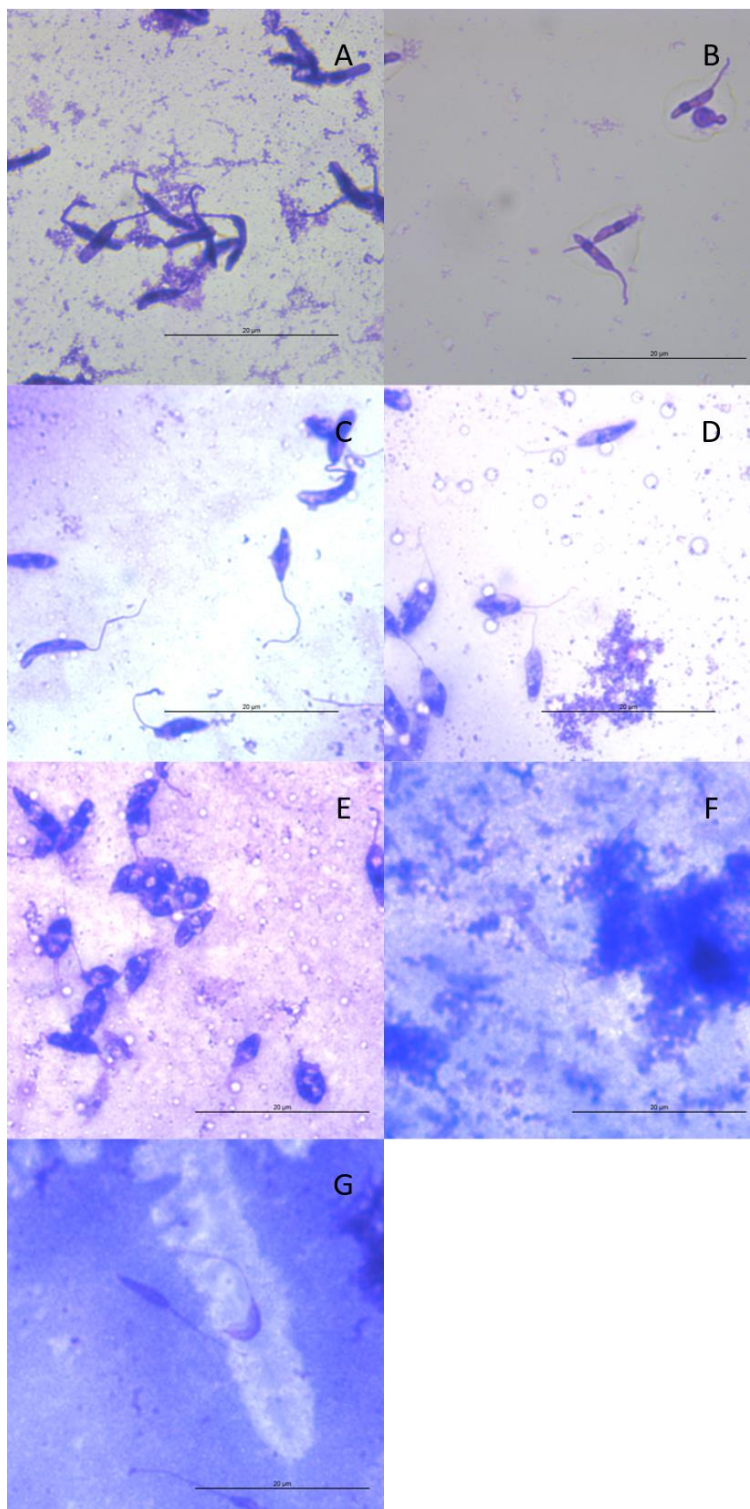


Figura 10. Comprimento (μm) (média + desvio-padrão) do corpo celular e do flagelo de promastigotas de *Leishmania amazonensis* expostos às diferentes concentrações de exosscreções larvais (ES) de *Cochliomyia macellaria*, meio RPMI e Anfotericina B após 12, 24 e 48 h. Letras iguais dentro do mesmo intervalo de tratamento não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

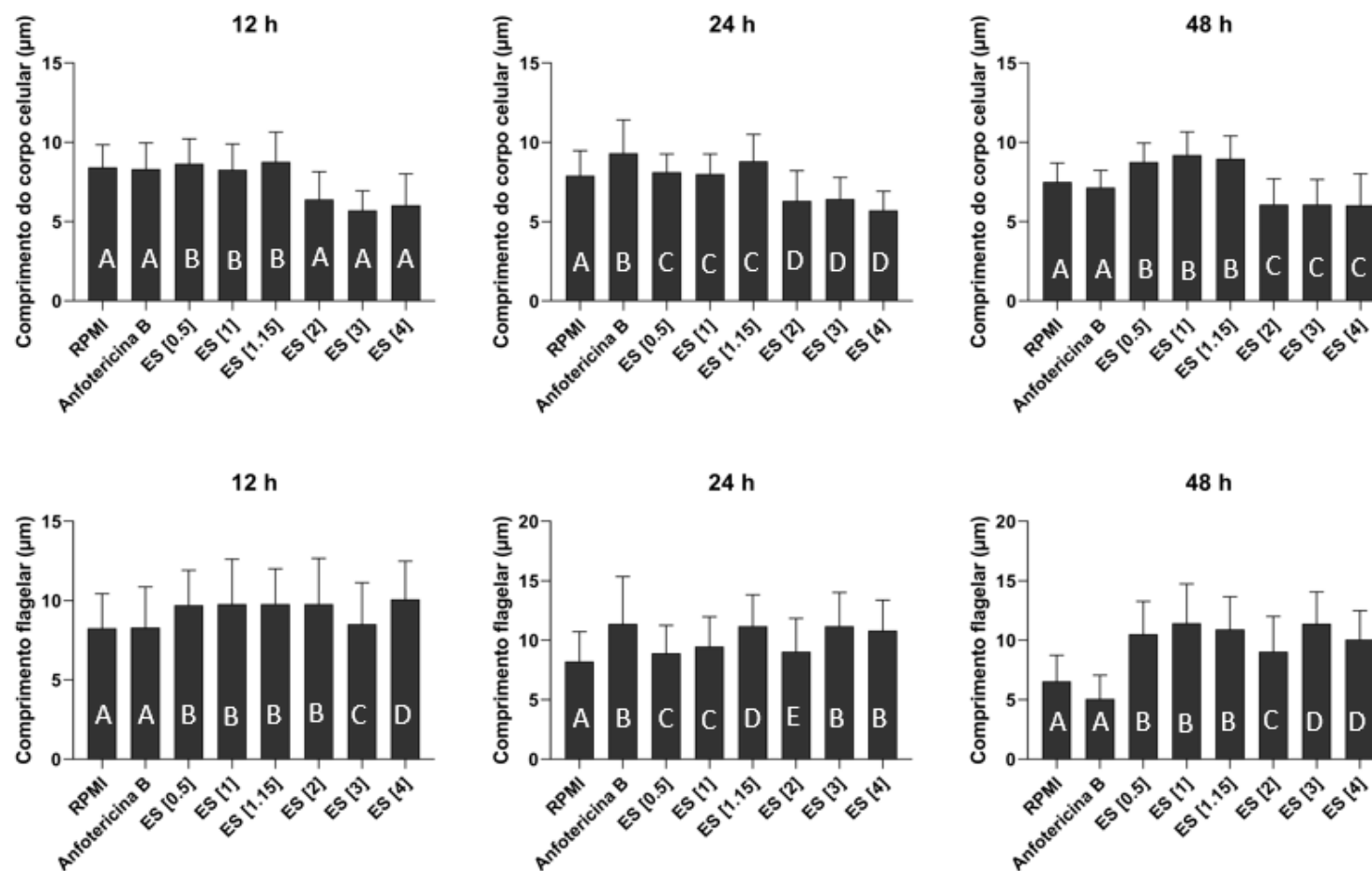
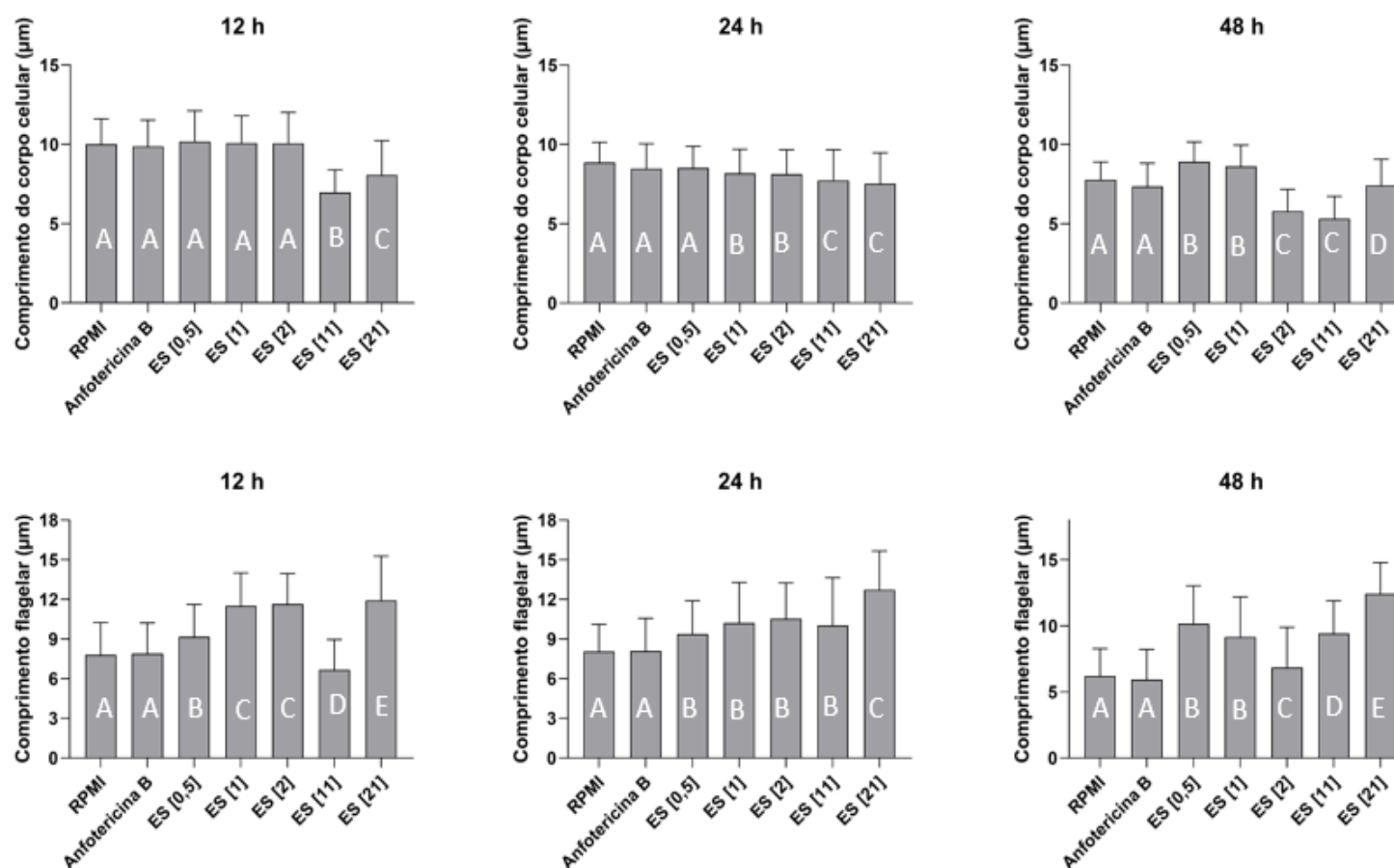


Figura 11. Comprimento (μm) (média + desvio-padrão) do corpo celular e do flagelo de promastigotas de *Leishmania amazonensis* expostos às diferentes concentrações de exosscreções larvais (ES) de *Chrysomya megacephala*, meio RPMI e Anfotericina B após 12, 24 e 48 h. Letras iguais dentro do mesmo intervalo de tratamento não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).



5. Conclusões gerais

Neste estudo foi possível concluir que:

- O método para extração e obtenção das ES, levando em consideração o custo-benefício, mais apropriado para condução de estudos *in vitro* foi aquele conduzido a partir da utilização de larvas em jejum de 8 h, as quais permaneceram em solução salina a 37°C no escuro por 1 h e cujos produtos finais, isto é, as exossecreções (ES) foram esterilizados com filtro bacteriológico. Neste caso, as ES obtidas e testadas foram capazes de inibir a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* e de bactérias gram positivas como *P. aeruginosa*.
- Em relação ao perfil das proteínas presentes nas ES larvais, para ambas as espécies de moscas aqui avaliadas foram observados padrões de peso molecular que variaram entre 11 e 80 kDa.
- As ES de maiores concentrações de *Cochliomyia macellaria* (ES[4], [3] e [2] mg/mL) e de *Chrysomya megacephala* (ES[21] e [11] mg/mL) foram as mais efetivas na inibição da proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*.
- Os valores de EC50 das ES de *Co. macellaria* (2,8, 2,4 e 1,9 mg/mL) e de *Ch. megacephala* (10,4, 14,5 e 5,8 mg/mL) variaram de acordo com os intervalos de exposição aos promastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente de 12 h, 24 h e 48 h.
- Independente dos intervalos de exposição, as maiores concentrações de ES de *Co. macellaria* ([4], [3] e [2] mg/mL) e de *Ch. megacephala* ([21] e [11] mg/mL) foram capazes de causar deformidades em promastigotas de *L. amazonensis*, tanto no corpo celular quanto nos flagelos.

6. Referências bibliográficas

- Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M.; WHO Leishmaniasis control team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One.*, 7: 1-12, 2012.
- Andersen, A.S., Sandvang, D., Schnorr, K.M., Kruse, T., Neve, S., Joergensen, B., Karlsmark, T., e K.A. Kroghfelt. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 1646-1654, 2010.
- Araújo, T.F, Calarga, A.P, Zorgi, N.E, Rangel, O, Levy, C.E, Giorgio, S. Phenotype evaluation of human and canine isolates of *Leishmania infantum*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 73, p. 101551, 2020.
- Arora, S., Sing, L.C., e C. Baptista. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. *Int. J. Integr. Biol.* 9: 43-48, 2010.
- Arrais-Silva, W.W., Pinto, E.F., Rossi-Bergmann, B., e S. Giorgio. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis* induced soft tissue lesions in mice. *Acta Trop.* 98: 130-136, 2006.
- Arrivillaga, J., Rodriguez, J., e M. Oviedo. Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica.* 28: 305-310, 2008.
- Baer WS. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). *J Bone Joint Surg* 13: 438-475, 1931.
- Barbosa, M.H.; Zuffi, F.B.; Maruxo, H.B.; Jorge, L.L.R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paulista de Enfermagem*, v.22, n.3, p.318-22, 2009.
- Barnes K.M, Gennard D.E, Dixon R.A. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bull Entomol Res* 100(6): 635-640, 2010.

- Bessa, L.J., Fazii, P., Di Giulio, M., Cellini, L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International wound journal*, v. 12, n. 1, p. 47-52, 2015.
- Bexfield, A., Bond, A.E. and E. Roberts. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata*. *Diptera: Calliphoridae. Micro. Infect.* 10: 325-333, 2008.
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., e N.A. Ratcliffe. Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect.* 6: 1297-1304, 2004.
- Bohova, J., Majtan, J., Majtan, V. and P. Takac. Selective Antibiofilm Effects of *Lucilia sericata* Larvae Secretions/Excretions against Wound Pathogens. *Ev. Bas. Complem. Alt. Med.* 1: 1-9, 2014.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Burlando B, Cornara L. Honey in dermatology and skin care: a review. *J Cosmet Dermatol.* 12(4):306-13, 2013.
- Burza, S., Croft, S.L., e M. Boelaert. Leishmaniasis. *The Lancet.* 392: 951-970, 2018.
- Carro G.V, Saurral R, Salvador F.S, Witman, E.L. Diabetic Foot Infections: Bacterial Isolates From the Centers and Hospitals of Latin American Countries. *Int J Low Extrem Wounds.* 2020
- Cazander, G., Pawiroredjo, J.S., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Schreurs, M.W.J., and G.N. Jukema. Synergism between maggot excretions and antibiotics. *Wound Rep. Reg.* 18: 637-642, 2010.
- Cazander, G., Van Veen K.E., Bernards, A.T., e G.N. Jukema. Do maggots have an influence on the bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of five 26 different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata*. *J. Tissue Viability.* 18: 80-87, 2009.

- Čeřovský V, Slaninová J, Fučík V, Monincová L, Bednářová L, Malón, P, Štokrová, J. Lucifensin, a novel insect defensin of medicinal maggots: synthesis and structural study. *ChemBioChem*. 12, 1352-1361, 2011.
- Čeřovský, V. and R. Bém. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: The story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals*. 7: 251-264, 2014.
- Čeřovský, V., Žďárek, J. and V. Fučík. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol. Life Sci*. 67: 455-466, 2010.
- Chernysh S, Kim S, Bekker G, Pleskach V, Filatova N, Anikin V. Antiviral and antitumor peptides from insects. *PNAS*. 99:12628—32, 2002.
- Codinho, B.S., Costa, S.S., Peloso, E.F., Joazeiro, P.P., Gadelha, F.R., e S. Giorgio. HSP70 of *Leishmania amazonensis* alters resistance to different stresses and mitochondrial bioenergetics. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 111: 460-468, 2016.
- Coelho, A.C. Miltefosine Susceptibility and Resistance in *Leishmania*: From the Laboratory to the Field. *J. Trop. Dis.*, 04: 1-5, 2016.
- Colhone, M.C.; Arrais-Silva, W.W.; Picolli, C.; Giorgio, S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. *J. Parasitol.*, 90: 510-515, 2004.
- Cooper R, Lawrence J.C. The isolation and identification of bacteria from wounds. *J Wound Care*. 5:335 – 40, 1996.
- Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v.284, p.1318–1322, 1999.
- Croft, S.L., e P. Olliaro. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect*. 17: 1478-1483, 2011.
- Croft, S.L., Sundar, S., e A.H. Fairlamb. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev*. 19: 111-126, 2006.

- Cruz-Saavedra, L., Díaz-Roa, A., Gaona, M.A., Cruz, M.L., Ayala, M., Cortés-Vecino, J.A., Patarroyo, M.A., e F.J. Bello. The effect of *Lucilia sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. *Acta Trop.* 164: 280-289, 2016.
- Dear, J.P. A revision of New World Crysomini (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Zool.* 3: 109-169, 1985.
- Degrossoli, A.; Giorgio, S. Functional alterations in macrophages after hypoxia selection. *Exp. Biol. Med.*, 232(1): 88-95, 2007.
- Díaz-Roa A, Espinoza-Culupú A, Torres-García O, Borges MM, Avino IN, Alves FL, et al. Antimicrobial Peptide Isolated from *Sarconesiopsis magellanica* Excretions and Secretions. *Molecules.* 24:2077, 2019.
- Díaz-Roa, A., Patarroyo, M.A., Bello, F. and P.I. Silva Jr. Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions and secretions with antibacterial properties. *Front. Microbiol.* 2249: 1-13, 2018.
- Dimarcq J.L, Keppi E, Dunbar B. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A. *Eur. J. Biochem.* 171, 1-2, 17-22, 1988.
- Dowsett, C.. The use of silver-based dressings in wound care. *Nurs. Stand.* 19 (7), 56–60, 2004.
- Dumville JC, Lipsky BA, Hoey C, Cruciani M, Fiscon M, Xia J. Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;6:CD011038.
- El Shazely B, Veverka V, Fucík V, Voburka Z, Zdárek J, Cerovský V. Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blow- fly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.*50:571—8, 2013.
- Ferreira E, Lucas R, Rossi LA, Andrade D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura *Rev Esc Enferm USP*; 37(1): 44-51, 2003.

- Ferreira, A.M.; Souza, B.M.V.; Rigotti, M.A.; Loureiro, M.R.D. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v.46, n.3, p.752-760, 2012.
- Figuerola, L.; Uherek, F.; Yusef, P.; López, L.; Flores, J. Experiencia de terapia larval en pacientes con úlceras crónicas. *Parasitol Latinoam.*, 61: 160-164, 2006.
- Fleischmann, W., Grassberger, M. and R. Sherman. *Maggot therapy: a handbook of maggot-assisted wound healing*. Stuttgart: Thieme Verlag, 2004.
- Fonseca-Muñoz, A., Sarmiento-Jiménez, H.E., Pérez-Pacheco, R., Thyssen, P.J. and R. Sherman. Clinical study of Maggot therapy for Fournier's gangrene. *Int. Wound J.* doi:10.1111/iwj.13444, 2020.
- Giglioti, R., Guimarães, S., Oliveira-Sequeira, T.C.G., David, E.B., Brito, L.G., Huacca, M.E.F., Chagas, A.C.S., e M.C.S. Oliveira. Proteolytic activity of excretory/secretory products of *Cochliomyia hominivorax* larvae (Diptera: Calliphoridae). *Pesq. Vet. Bras.* 36: 711-718, 2016.
- Grella, M.D.; Thyssen, P.J. Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil, 2011. Disponível em: <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil> Acesso em 24 de outubro de 2017.
- Grimaldi, G.J.R.; Tesh, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 230-250, 1993.
- Hamú Z.C, Pinto M.M, Chagas L.A.F. Ácidos graxos essenciais, vitaminas A, E e lecitina de soja: uma nova opção no tratamento de lesões com perda de substância com ou sem presença de infecção. *Revista Brasileira de Medicina* 56: 01-07, 1999.
- Han, G; Ceilley, R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in therapy*, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017.

- Harris LG, Bexfield A, Nigam Y, Rohde H, Ratcliffe NA, Mack D. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *International Journal of Artificial Organs*, v.32, n.9, p.555-564, 2009.
- Henry, W.M.; Berman, J.D.; Davies, C.D.; Saravia, N. Advances in leishmaniasis. *The Lancet* 366 (9496): 1561-1577, 2005.
- Hoffmann, J.A., e C. Hetru. Insect defensins: inducible antimicrobial peptides. *Immunol. Today*. 13: 411-415, 1992.
- Honda, K., Okamoto, K., Mochida, Y., Ishioka, K., Oka, M., Maesato, K. and K. Doi. A novel mechanism in maggot debridement therapy: protease in excretion/secretion promotes hepatocyte growth factor production. *Am. J. Physiol-Cell Physiol*. 301: 1423-1430, 2011.
- Horobin AJ, Shakesheff KM, Woodrow S, Robinson C, Pritchard DI. Maggots and wound healing: the effects of *Lucilia sericata* larval secretions upon human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol*. 148: 923-933, 2003.
- Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu K. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol*. 21, 2, 127-131, 2007.
- Jiang, K.C., Sun, X.J., Wang, W., Liu, L., Cai, Y., Chen, Y.C., Luo, N., Yu, J.H., Cai, D.Y. and A.P. Wang. Excretions/secretions from bacteria-pretreated maggot are more effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One*. 7(11): 1-4, 2012.
- Józefiak, A., e R.M. Engberg. Insect proteins as a potential source of antimicrobial 27 peptides in livestock production. A review. *J. Anim. Feed Sci*. 26: 87-99, 2017.
- Kerridge, A., Lappin-Scott, H., e J.R. Stevens. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol*. 19: 333-337, 2005.
- Kevric, I., Cappel, M.A., e J.H. Keeling. New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. *Dermatol. Clin*. 33: 579-593, 2015.
- Kon, K. and M. Rai. Natural Remedies for the Treatment of Wounds and Wound Infection. In: *Microbiology for Surgical Infections*. Academic Press. pp. 187-203, 2014.

- Kruglikova, A.A. and S.I. Chernysh. Antimicrobial compounds from the excretions of surgical maggots, *Lucilia sericata*. Meigen. Diptera, Calliphoridae. Entomol. Rev. 91: 813–819, 2011.
- Ladion, WLB, Solon CCE, Valdez SAL, Valera-Magaso A. Lucilyn Lahoylahoy-Maratas. In Vitro Antimicrobial Activity of Calliphorid Larval Excreta/Secreta (ES) Against Selected Wound Bacteria. Adv. Environ. Biol., 9(19), 88-95, 2015.
- Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J. L., Wicker, C., Reichhart, J. M., Dunbar, B., Lepage P., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J. & Fothergill, J. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(1), 262-266, 1989.
- Lansdown, A.B. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. Journal of Wound Care, v.11, n.4, p.125-130, 2002.
- Laverde-Paz, MJ., Echeverry, MC., Patarroyo, MA., Bello, FJ. Evaluating the anti-leishmania activity of *Lucilia sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions/secretions in an in vitro model. Acta tropica, v. 177, p. 44-50, 2018.
- Lazarus, G.S.; Cooper, D.M.; Knighton, D.R.; Margolis, D.J.; Pecoraro, R.E.; Rodeheaver, G.; Robson, M.C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. Archives of dermatology, v.130, p.489-493, 1994.
- Leite, A.P.; Oliveira, B.G.R.B.; Soares, M.F.; Barrocas, D.L.R. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. Revista Gaúcha de Enfermagem, v.33, n.3, p.198-207, 2012.
- Lipsky BA, Senneville E, Abbas ZG, Aragón-Sánchez J, Diggle M, Embil JM, Kono S, Lavery LA, Malone M, Asten SA, Urbančič-Rovan V, Peters EJG Guideline on the diagnosis and treatment of foot infection in persons with diabetes (IWGDF 2019 update). Diabetes-Metabolism Research and Reviews. V. 36, 2020.
- Luz, J.S.B, Oliveira, E.B., Martins, M.C.B., Silva, N.H., Alves, L.C., Santos, F.A.B, Silva, L.L.S., Silva, E.C., e P.L. Medeiros. Ultrastructural analysis of *Leishmania infantum*

- chagasi promastigotes forms treated in vitro with usnic acid. Scientific World J. 2015: 617401, 2015.
- Marques SA, Abbade LPF. Severe bacterial skin infections. An Bras Dermatol. 95:407-417, 2020.
- Martini, R.K.; Sherman, R.A. Terapia de Desbridamento com Larvas. J. Bras. Med., 85(4): 82-85, 2003.
- Masiero, F.S., Aquino, M.F., Nassu, M.P., Pereira, D.I., Leite, D.S., e P.J. Thyssen. First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Neotrop. Entomol. 46: 125-129, 2017.
- Masiero, F.S., Nassu, M.P., Soares, M.P. and P.J. Thyssen. Histological patterns in healing chronic wounds using *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larvae and other therapeutic measures. Parasitol. Res. 114: 2865-2872, 2015.
- Masiero, F.S., Silva, D.G., Luchese, M., Estércio, T., Pérsio, N.V. and P.J. Thyssen. In vitro evaluation of the association of medicinal larvae (Insecta, Diptera, Calliphoridae) and topical agents conventionally used for the treatment of wounds. Acta Trop. 190: 68-72, 2019.
- Masiero, F.S.; Thyssen, P.J. Evaluation of conventional therapeutic methods versus maggot therapy in the evolution of healing of tegumental injuries in Wistar rats with and without diabetes mellitus. Parasitology Research, v.115, n.6, p. 2403-2407, 2016.
- Mohamed, N.T. Activity of two serine proteases and anti-bacterial studies on both excretory/secretory products and whole body homogenates of third instar larvae of *Chrysomya megacephala*. Int. J. of Adv. Res. 3 (4). (ISSN 2320-5407), 2015.
- Monetta L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. Revista Brasileira de Enfermagem, v.40, n.1, p.66-73, 1987.

- Moretti TC, Thyssen PJ, Solis DR. Breeding of the Scuttle Fly *Megaselia scalaris* in a fish Carcass and Implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). *Entomol. Gen.* 31: 349-353, 2009.
- MS. Ministério da Saúde Brasileiro, Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. 189 p.,2017.
- Mumcuoglu, K.Y., Miller, J., Mumcuoglu, M., Friger, M., e M. Tarshis. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 38: 161-166, 2001.
- Nassu, M. P., and P. J. Thyssen. Evaluation of larval density *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic use in the recovery of tegumentar injuries. *Parasitol. Res.* 114: 3255–3260, 2015.
- Otter, J. A., & French, G. L. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the case for a genotypic definition. *Journal of Hospital Infection*, 81(3), 143-148.
- Pace, D. 2014. Leishmaniasis. *J. Infect.* 69: 1-9, 2012.
- Paris, C.; Loiseu, P.M.; Bories, C.; Breard, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 852-859, 2004.
- Pavillard, E.R., e E.A. Wright. An antibiotic from maggots. *Nature.* 180: 916-917, 1957.
- Peters EJ, Lipsky BA, Aragon-Sanchez J, et al. Interventions in the management of infection in the foot in diabetes: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev.* 32 Suppl 1:145-53, 2016.
- Pinheiro, M.A.; Ferraz, J.B.; Junior, M.A.; Moura, A.D.; Costa, M.E.; Costa, F.J.; Neto, V.F.; Neto, R.M.; Gama, R.A. Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. *Indian. J. Med. Res.*, 141: 340-342, 2015.
- Polat, E., Cakan, H., Aslan, M., Sirekbasan, S., Kutlubay, Z., Ipek, T., e A. Ozbilgin. Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: first work. *Exp. Parasitol.* 132: 129-134, 2012.

- Polonio, T., e T. Efferth.. Leishmaniasis: drug resistance and natural products. *Int. J. Mol. Med.* 22: 277-286, 2008.
- Ponte-Sucre, A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* 2: 14, 2003.
- Pöppel AK, Koch A, Kogel KH, Vogel H, Kollewe C, Wiesner J, et al. Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. *Biol Chem.* c395(6):649–656, 2014.
- Ratcliffe, N.A., Vieira, C.S., Mendonça, P.M., Caetano, R.L., Queiroz, M.M.C., Garcia, E.S., Mello, C.B., e P. Azambuja. Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. *Acta Trop.* 147: 6-11, 2015.
- Reis, A.B., e C.M.F. Gontijo. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36: 71-80, 2016.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., e S. Brooker. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7: 581-596, 2007.
- Sanei-Dehkordi, A., Khamesipour, A., Akbarzadeh, K., Akhavan, A.A., Mohammadi, A.M., Mohammadi, Y., Rassi, Y., Oshaghi, M.A., Alebrahim, Z., Eskandari, S.E., e J. Rafinejad. Anti *Leishmania* activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. *Exp. Parasitol.* 170: 59-65, 2016.
- Santos J.B, Porto S.G, Suzuki L.M, Sostizzo L.Z, Antoniazzi J.L. Avaliação e tratamento de feridas: orientações aos profissionais de saúde. 2011. <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/34755/000790228.pdf> (accessed 03 March 2019).
- Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio UF, Caroleo B, Amato B, Gallelli L, Francis S. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* Early online, 1–9, 2015.

- Shadab, M.D., Jha, B., Asad, M., Deepthi, M., Kamran, M., e N. Ali. Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. *PLoS One*. 12: e0171306, 2017.
- Sherman, R., Hall, M.J.R. and S. Thomas. Medical Maggots: an Ancient Remedy for some Contemporary Afflictions. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 55-81, 2000.
- Sherman, R.A. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here? *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014: 592419, 2014.
- Simmons, S.W. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. *J. Bacteriol.* 30: 253-267, 1935.
- Stoodley, P., Sauer, k., Davies, D.g., Costerton, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.
- Stulberg, D. L., Penrod, M. A., & Blatny, R. A. Common bacterial skin infections. *American family physician*, 66(1), 119, 2002.
- Thomas, S., Andrews, A.M., Hay, H.P., e S. Bourgoise. The anti-microbial activity of maggots: results of preliminary study. *J. Tissue Viab.* 9: 127-132, 1999.
- Thyssen, P.J., Ferraz, J.B., Masiero, F.S., Suguimoto, P.U., e Silva, S.M. Terapia do Desbridamento Larval: como a biologia atua em favor da reparação e cicatrização tecidual. In: Parisi, M.C.R., Leite, C.R.M., Rosa, M.F.F. (orgs.) *Interdisciplinaridade no contexto do pé diabético: tratamentos clínicos, políticas públicas e tecnologias em saúde*. SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes. pp 213-237, 2021.
- Thyssen, P.J., Nassu, M.P., Nitsche, M.J.T., e D.S. Leite. Sterilization of immature blowflies (*Calliphoridae*) for use in larval therapy. *J. Med. Sci.* 4: 405-409, 2013.
- Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, Holland TL, Fowler Jr VG. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 17:203-218, 2019.
- Uliana, S.R.B. *Leishmania e leishmanioses*. In: Ferreira, M.U. (org) *Parasitologia contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. pp. 47-56, 2012.

- Valachova, I., Prochazka, E., Bohova J., Novak, P., Takac, P., e J. Majtan. Antibacterial properties of lucifensin in *Lucilia sericata* maggots after septic injury. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4: 358-361, 2014.
- Van Der Plas M.J, Dambrot C, Dogterom-Ballering H.C, Kruithof S, Van Dissel J.T, Nibbering P.H. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* v.65, n.5, p.917-923, 2010.
- Vanaerschot, M.; Dumetz, F.; Roy, S.; Ponte-Sucre, A.; Arevalo, J.; Dujardin, J.C. Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-)phenotype? *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 12: 937-946, 2014.
- WHO. 2016. World Health Organization – Leishmaniasis, fact sheet. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acessado em 24 set 2020.
- WHO. 2018. World Health Organization – Status of endemicity and disease burden worldwide. <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acessado em 25 set 2020.
- Wolff H, Hansson C. Larval therapy – an effective method of ulcer debridement. *Clin Experimental Dermatol* 28(2): 134-137, 2003.

7. Anexos

Anexo 1 – Declaração de bioética e biossegurança.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “***Exossecreções de larvas de dípteros (Diptera: Calliphoridae): padronização para obtenção e avaliação in vitro da sua ação sobre a forma promastigota de Leishmania amazonensis***”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura:

Nome da aluna: Leticia Salvioni Ansaloni

Assinatura: _____

Nome da orientadora: Patrícia Jacqueline Thyssen

Data: 13/06/2019

Anexo 2. Declaração de direito autoral

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Exossecreções de larvas de dípteros (Diptera: Calliphoridae): padronização para obtenção e avaliação in vitro da sua ação sobre a forma promastigota de Leishmania amazonensis**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 25/02/2021

Leticia Salvioni Ansaloni

Assinatura : _____

Nome da autora: Leticia Salvioni Ansaloni

RG n.º 40455324-2



Assinatura : _____

Nome da orientadora: Patrícia Jacqueline Thyssen

RG n.º 22771091-5